

Université de Sherbrooke

L'altération peptidique de l'activité GTPasique de Rab4, un premier pas vers le
développement d'inhibiteurs de la GTPase

Par
Samuel Picard
Programme de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril, 2021

Membres du jury d'évaluation
Pr Jean-Luc Parent, Pharmacologie
Pr Éric Marsault, Pharmacologie
Pr Michel Grandbois, Pharmacologie
Pr Caroline Saucier, Immunologie et biologie cellulaire

© Samuel Picard, 2021

RÉSUMÉ

L'altération peptidique de l'activité GTPasique de Rab4, un premier pas vers le développement d'inhibiteurs de la GTPase

Par

Samuel Picard

Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *maître ès sciences* (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La petite GTPase Rab4 est un membre de la superfamille des GTPases Ras. De concert avec une panoplie d'autres protéines, elle régule le recyclage entre la membrane plasmique et l'endosome précoce. Son association avec une prostaglandine synthase, la L-PGDS, a été précédemment démontrée au laboratoire. L-PGDS active Rab4 *in vitro* et *in cellulo* via l'accélération de son cycle de chargement en GTP. Ces deux protéines coopèrent dans le recyclage du récepteur aux prostaglandines type-D 1 (DP1) à la membrane plasmique.

Sachant ainsi que Rab4 interagit directement avec L-PGDS et que cette interaction entraîne l'activation de la GTPase, l'objectif de mon projet fut de créer une gamme de peptides basés sur la séquence d'interaction L-PGDS/Rab4, et ce dans le but d'affecter l'activité de Rab4, dont l'expression est élevée dans divers cancers.

Nous avons donc procédé à la synthèse de divers peptides sur phase solide, dans le but d'évaluer leur effet sur Rab4. Nous avons également mis à l'épreuve une panoplie de méthodes de quantification des effets sur Rab4 entraînés par l'ajout de ces peptides. Nous avons premièrement réalisé des pulldowns par affinité ainsi que des essais de chargement en GTPγS de Rab4. Nous avons exploité la fluorescence des tryptophanes de Rab4 afin de sonder l'évolution de son état de chargement nucléotidique à travers le temps. Ces expériences nous ont permis d'extraire des constantes de vitesse de la réaction de chargement. Nous avons effectué des expériences d'anisotropie de fluorescence afin de quantifier l'affinité des peptides envers Rab4. Nous avons également procédé à la purification de Rab4 radiomarkée afin d'effectuer des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) de protéine en solution, nous permettant de caractériser la structure de Rab4 et l'effet des peptides sur celle-ci. De plus, nous avons réalisé des expériences de protéomique de Rab4 et de ses mutants afin d'identifier de nouveaux partenaires potentiels. Nous avons également entamé le design d'un biosenseur FRET de Rab4, dans l'optique d'utiliser celui-ci pour en apprendre davantage sur la localisation cellulaire de la Rab4 active. En tout et partout, ces expériences nous ont permis d'identifier les acides aminés Q88, C89 et E90 de L-PGDS comme des éléments cruciaux pour son effet activateur de Rab4. Nous avons également pu identifier les acides aminés de Rab4 qui sont affectés par la liaison du peptide WT 85-92.

Pour conclure, cette présente étude a permis de faire un premier pas dans le design rationnel d'inhibiteurs de Rab4, tout en développant des méthodes et outils utiles pour la caractérisation des effets de ceux-ci.

Mots clés : petites GTPases, Rab4, inhibition, synthèse peptidique, invadosomes

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Introduction	1
1 Le transport vésiculaire	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Les petites GTPases.....	1
1.2.1 Rabs et transport vésiculaire.....	2
1.3 Interrupteurs moléculaires	3
2 Structure et régulation	4
2.1 GEFs et GAPs	4
2.2 Régulation et modifications post-traductionnelles	5
2.3 Mutants.....	6
2.4 Structure et domaines	6
3 Fonction et évolution.....	10
3.1 Rabs et organites.....	10
3.1.1 Couplage fonctionnel.....	12
3.1.2 Recyclage	12
3.2 Partenaires d'interaction connus.....	13
4 Expression et pathologie.....	14
4.1 Expression tissulaire.....	14
4.2 Rabs et pathologies associées.....	15
4.2.1 CSTN et invadosomes	15
Question principale.....	17
But de l'étude	17
Hypothèse	17
Objectifs	17
Matériel et méthodes	18
1. Synthèse peptidique sur phase solide	18
2. Expression et purification de protéines recombinantes	19

3. Pulldown par affinité	20
4. Essais de chargement en GTP γ S	21
5. RMN de protéine en solution	22
6. Culture cellulaire	22
7. Immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse (IP-MS).....	22
8. Anisotropie de fluorescence	23
9. Essais de fluorescence intrinsèque des tryptophanes.....	23
Résultats	24
1. Synthèse de peptides dérivés de la séquence de L-PGDS	24
2. Pulldown par affinité, compétition entre la L-PGDS et le peptide natif à séquence longue .	27
3. Essais de chargement en GTP γ S, activation peptidique de Rab4.....	29
4. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes de Rab4	32
5. Anisotropie de fluorescence, élucidation de l'affinité.....	38
6. RMN de protéine en solution, site d'interaction de Rab4	40
7. Design du biosenseur FRET de Rab4.....	41
8. Protéomique de Rab4	44
Discussion	47
1. Criblage des peptides.....	47
2. Méthodes utilisées, validité	48
2.1. Synthèse peptidique sur phase solide	48
2.2. GTP γ S-loadings.....	48
2.3. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes	49
2.4. Anisotropie	51
2.5. RMN.....	51
2.6. Biosenseur FRET de Rab4	52
3. Élucidation structurelle.....	52
4. Peptides TAT et modèle in cellulo	54
5. Conséquences cellulaires attendues d'une inhibition de Rab4	55
6. Mécanismes d'action possibles	57
7. Partenaires potentiels identifiés en protéomique	59
Conclusion.....	62
Perspectives	62
Liste des références	63
Annexe 1 : Fiches de caractérisation	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les GTPases de la superfamille Ras humaine	2
Figure 2 : Alignement de séquence des GTPases Rab4, Rab5 et Rab7.....	3
Figure 3 : Cycle général d'activation/inactivation des petites GTPases.....	5
Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la petite GTPase Rab4	8
Figure 5 : Disposition des domaines Switch I, SwitchII et P-loop.....	9
Figure 6 : Représentation de la surface occupée par les atomes de Rab4	10
Figure 7 : Survol des fonctions cellulaires des Rabs	11
Figure 8 : Structure et séquence de L-PGDS.....	25
Figure 9 : Pulldown par affinité des protéines Rab4-His ₆ et L-PGDS-GST, en absence et en présence d'un peptide dérivé de la séquence de L-PGDS	29
Figure 10 : Essais d'activation de Rab4 de type GTP γ S-loading.....	32
Figure 11 : Fluorescence intrinsèque des tryptophanes de Rab4.....	34
Figure 12 : Chargement intrinsèque de Rab4 en temps réel.....	35
Figure 13 : Cinétique de chargement en GTP γ S de Rab4	37
Figure 14 : Anisotropie de fluorescence des tryptophanes de Rab4.....	39
Figure 15 : Superposition des spectres HSQC de Rab4-GDP en présence et en absence du peptide WT 85-92	41
Figure 16 : Représentation théorique simple du fonctionnement du biosenseur unimoléculaire FRET de Rab4	42
Figure 17 : Élucloration de la séquence minimale du domaine de liaison à Rab4 de RABEP1	43
Figure 18 : Représentation de l'orientation présumée du peptide WT (ruban) sur Rab4 (surface).....	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Peptides dérivés de la séquence de L-PGDS, synthétisés sur phase solide	26
Tableau 2 : Constantes de vitesse de chargement en GTP γ S de Rab4	37
Tableau 3 : Extrait des interacteurs potentiels de Rab4.....	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
AU	unités arbitraires
BEH	<i>ethylene bridged hybrid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CSTN	cancer du sein triple-négatif
CDC42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	ADN complémentaire
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DO	densité optique
DP1	<i>D-type prostanoid receptor 1</i>
DTT	dithiothréitol
EDT	1,2-éthanedithiol
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EHD	domaine protéique EH
EtOH	éthanol
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	guanosine diphosphate
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GGTase	géranylgéranyltransférase
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GNAI1	<i>guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	<i>guanosine triphosphate hydrolase</i>
GTP γ S	guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate
HATU	hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
IGEPAL	octylphenoxy polyethoxyethanol
IP-MS	<i>immunoprecipitation-mass spectrometry</i>
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IQGAP1	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LECA	<i>last eukaryote common ancestor</i>

L-PGDS	<i>lipocalin-type prostaglandin D synthase</i>
MDA-MB-231	<i>human mammary carcinoma cell line</i>
MRPL11	<i>39S ribosomal protein L11, mitochondrial</i>
MT1-MMP	<i>métalloprotéinases de matrices de type 1</i>
NF-kappa-B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHE5	<i>sodium/hydrogen exchanger 5</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
PARD3	<i>partitioning defective 3 homolog</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PDZ	<i>domaine protéique</i>
PHB	<i>prohibitin</i>
PI3P	<i>phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
RABEP1	<i>RAB GTPase binding effector protein 1</i>
RABGAP1	<i>RAB GTPase activating protein 1</i>
RAM	<i>Rink amide</i>
RBSN	<i>Rabenosyn-5</i>
REP	<i>Rab escort protein</i>
RMN	<i>résonance magnétique nucléaire</i>
SASH1	<i>SAM and SH3 domain-containing protein 1</i>
SCAMP2/3	<i>secretory carrier-associated membrane protein 2/3</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TAT	<i>trans-activator of transcription</i>
TFA	<i>acide trifluoroacétique</i>
TIAM1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i>
TIPS	<i>triisopropylsilane</i>
TP β	<i>thromboxane receptor beta</i>
Trp	<i>tryptophane</i>
UPLC-MS	<i>ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
VPS13C	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 13C</i>
WT	<i>wild-type</i>
X##Y (ex.: Q67L)	désigne une mutation : X = acide aminé initial, ## = position, Y = acide aminé muté

INTRODUCTION

1 LE TRANSPORT VÉSICULAIRE

1.1 Généralités

Les processus moléculaires cruciaux au maintien de l'homéostasie cellulaire sont vastes et complexes. Parmi ceux-ci se distinguent la formation et le maintien d'une panoplie de vésicules aux rôles et provenances distinctes. Qu'il s'agisse du tri de cargos et de l'acheminement de ceux-ci entre les organites, de la dégradation localisée de protéines via l'action d'un milieu acide riche en protéase, ou bien encore de la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire, l'intégrité cellulaire et physiologique en est tributaire. Évidemment, l'existence d'une telle compartimentalisation sous-entend une pléiade de mécanismes régulateurs qui y sont associés. Que l'on aborde le transport de ces vésicules via leur association au cytosquelette, ou encore l'arrimage et la fusion de celles-ci à leur membrane acceptrice, on peut facilement supposer la formation de complexes protéiques dont la spécificité d'interaction permet le niveau d'organisation observé. Les efforts chevronnés des chercheurs ont pu mettre en évidence plusieurs mécanismes de régulation permettant une meilleure compréhension de ces processus, notamment vis-à-vis la question de l'identité vésiculaire.

1.2 Les petites GTPases

Premièrement identifiée en 1979 à la suite de l'investigation de rétrovirus oncogènes menant à la formation de sarcomes chez divers mammifères, la première petite GTPase fut d'abord nommée p21 *src*, d'après son poids moléculaire et son potentiel oncogénique (Shih et al., 1979). Ce n'est qu'en 1980 que les chercheurs purent identifier qu'une version similaire de cette protéine virale était également exprimée de manière endogène chez les mammifères (Langbeheim et al., 1980). Les travaux subséquents démontrèrent que la surexpression de cette protéine endogène menait également à la transformation oncogénique des cellules affectées (Scolnick et al., 1979). Ces découvertes ont pavé la voie vers l'identification d'une multitude de protéines présentant une homologie de séquence. La nomenclature de ces protéines fut ainsi inspirée de la première petite GTPase identifiée, nommée Ras (rat sarcoma). Cette superfamille des Ras GTPases dénombre aujourd'hui 5 sous-familles de petites GTPases, ayant toutes des fonctions cellulaires distinctes

(Wennerberg et al., 2005) (Figure 1). Mon projet de recherche met l'accent sur une protéine de la sous-famille possédant le plus de membres, soit celle des Rab.

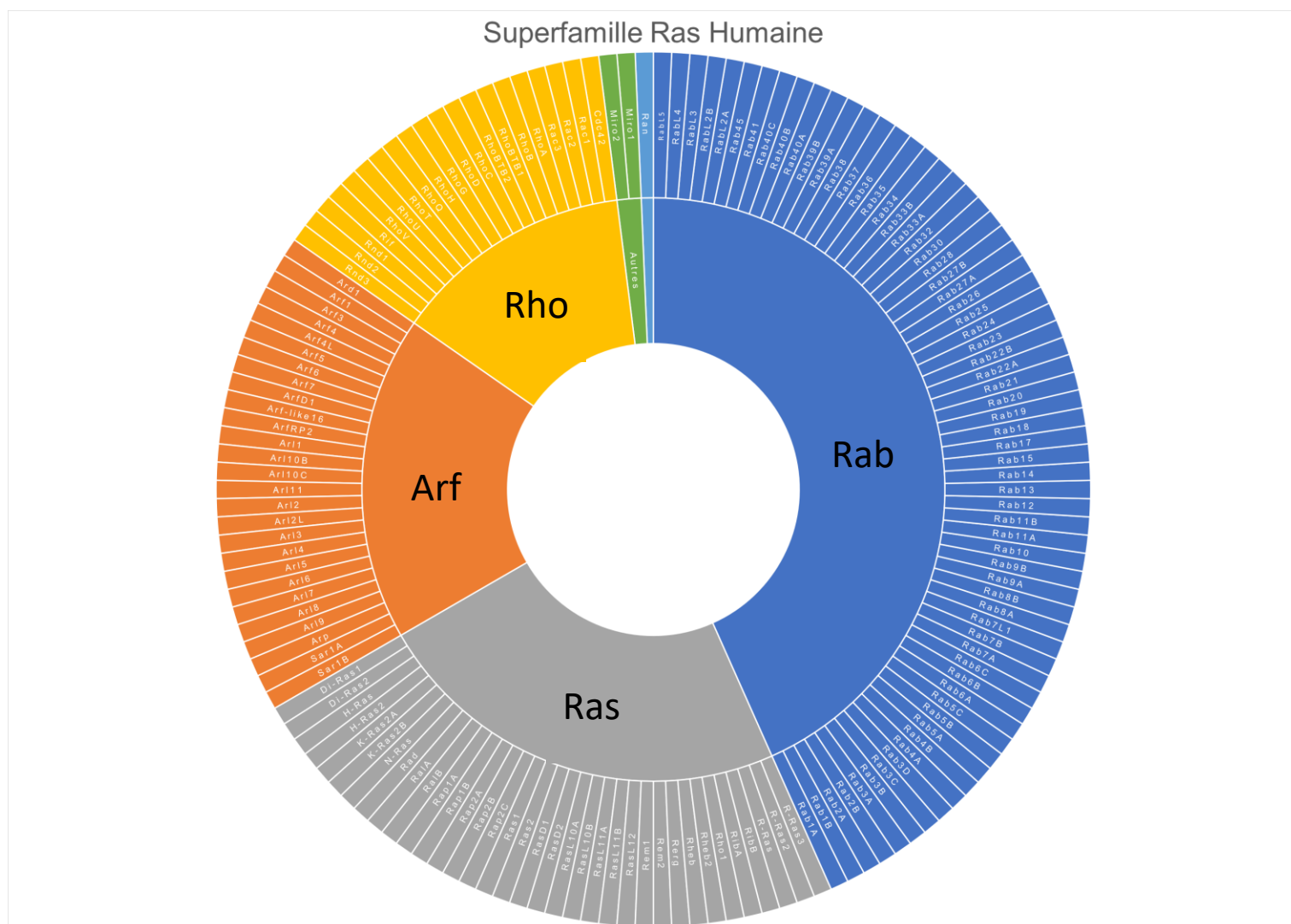


Figure 1 : Les GTPases de la superfamille Ras humaine. Les membres des sous-familles Rab, Ras, Arf, Rho et Ran sont représentées en bleu, gris, orange, jaune et cyan, respectivement. La catégorie Autres, en vert, représente les GTPases mitochondriales Miro1 et Miro2. On constate la prépondérance des membres de la sous-famille des Rabs.

1.2.1 Rabs et transport vésiculaire

La sous-famille des Rab est connue pour son rôle dans le transport vésiculaire entre les multiples organites cellulaires (Stenmark & Olkkonen, 2001). Leurs partenaires d'interaction et elles-mêmes contrôlent les étapes cruciales du transport vésiculaire, soit la séquestration du cargo, le bourgeonnement de la membrane donneuse, le transport de la

vésicule jusqu'à la membrane acceptrice ainsi que la fusion de la vésicule à celle-ci (Zerial & McBride, 2001). Ces étapes et le haut niveau d'organisation qu'elles sous-entendent nécessitent une importante spécificité d'interaction entre les différentes Rabs et leurs partenaires d'interaction, et ce malgré la grande homologie de séquence et de structure que partagent les multiples Rabs (Figure 2), dont on dénombre aujourd'hui plus de 60 membres chez l'humain. Afin d'atteindre ce niveau d'organisation, ces petites GTPases présentent plusieurs caractéristiques faisant d'elles les protéines parfaites pour exercer leur fonction.



Figure 2 : Alignement de séquence des GTPases Rab4, Rab5 et Rab7. On constate la conservation des acides aminés, en noir, ainsi que les acides aminés présentant des propriétés physicochimiques semblables, en gris. Les domaines P-loop, Switch I et Switch II sont également indiqués.

1.3 Interrupteurs moléculaires

Les petites GTPases sont souvent qualifiées d'interrupteurs moléculaires (Gilman, 1987). Ce rôle est assumé par la capacité qu'ont ces protéines à osciller entre une forme active et inactive. Cette dualité est dépendante du ligand présent dans la pochette catalytique. Comme leur nom l'indique, ces protéines ont la capacité de se lier au guanosine triphosphate (GTP) et, sous leur action catalytique, d'hydrolyser celui-ci en guanosine diphosphate (GDP). C'est la liaison à l'un ou à l'autre de ces nucléotides qui détermine l'affinité de la GTPase pour ses protéines effectrices (Jacqueline Cherfils & Zeghouf,

2011). Lorsque GTP-liée, la GTPase est dite active. Sous sa propre action catalytique, dont l'efficacité varie de membre en membre, la GTPase va éventuellement hydrolyser son GTP en GDP et ainsi moduler sa conformation tridimensionnelle (Vetter & Wittinghofer, 2001). Ce changement de conformation dans certaines des régions clé de la GTPase va grandement affecter l'affinité que celle-ci possède envers ses protéines effectrices (Stenmark & Olkkonen, 2001).

2 STRUCTURE ET RÉGULATION

2.1 GEFs et GAPs

En plus d'être régulées par leur capacité d'hydrolyse intrinsèque, la plupart des petites GTPases interagissent avec des protéines qui permettent de favoriser un état d'activation plutôt que l'autre (Bos et al., 2007). En effet, il existe deux classes de protéines connues pour influencer ce cycle d'activation. Les « guanine nucleotide exchange factors » ou GEFs promeuvent l'activation de la petite GTPase en favorisant l'expulsion du GDP de la pochette catalytique (Toma-Fukai & Shimizu, 2019). Étant donné que la concentration cytosolique du GTP est de 10 fois supérieure à celle du GDP (Bos et al., 2007), cette action aura pour effet de remplacer le GDP présent dans la pochette par du GTP, menant ainsi à la formation de la GTPase activée. D'une autre part, même si les GTPases possèdent une activité catalytique intrinsèque, la nature a développé des protéines permettant d'accélérer leur désactivation. Les « GTPase-activating proteins » ou GAPs permettent de favoriser l'hydrolyse du GTP présent dans la pochette catalytique et d'inactiver la GTPase (J. Cherfils & Zeghouf, 2013). Il va sans dire que l'existence de telles protéines sous-entend une régulation de l'activité des GTPases via l'expression régulée des GEFs et des GAPs.

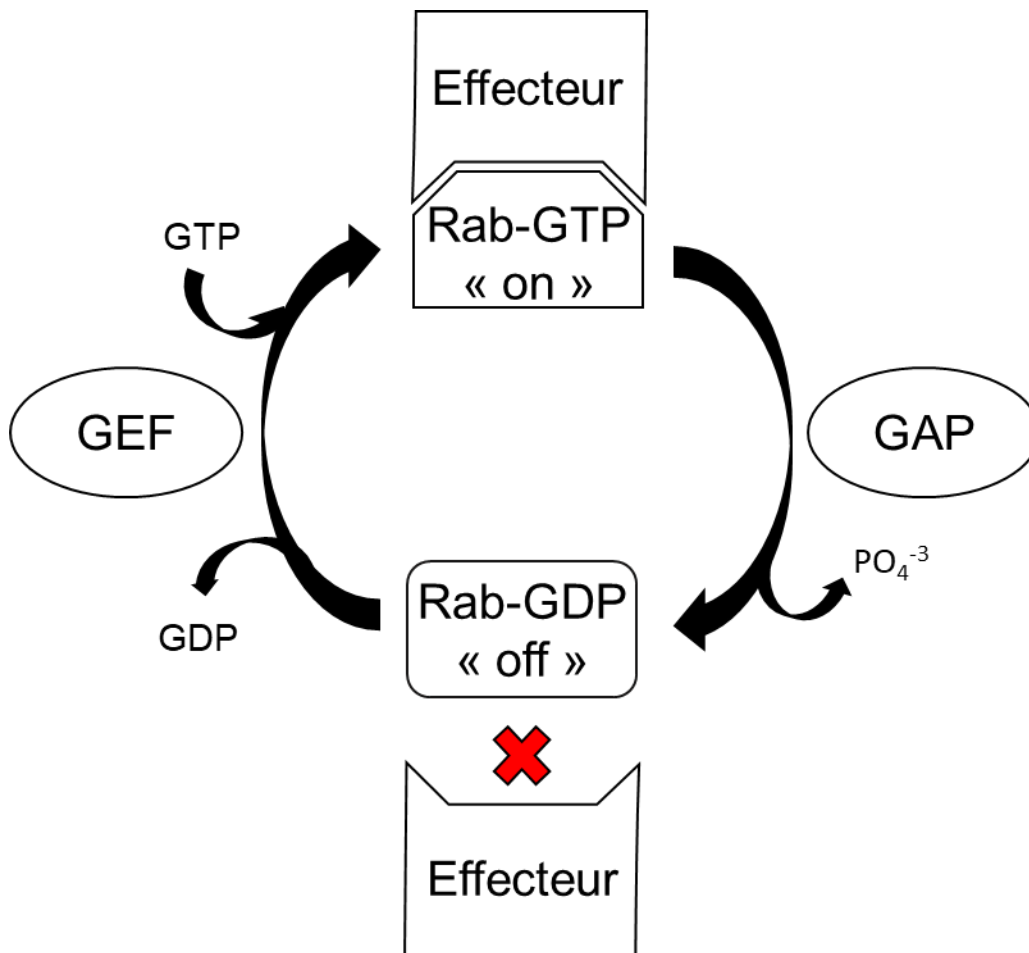


Figure 3 : Cycle général d'activation/inactivation des petites GTPases. Les GTPases, Rab pour ce cas de figure, présentent une affinité amoindrie pour leurs protéines effectrices lorsque GDP-liées. Sous l'action d'une protéine GEF spécifique à la GTPase, l'expulsion du GDP de leur site actif est accélérée, permettant l'entrée du GTP dans celui-ci. Lorsque GTP-liées, les GTPases présentent, en règle générale, une plus forte affinité pour leurs protéines effectrices spécifiques, leur permettant d'exercer leurs fonctions moléculaires. Leur retour à l'état inactif est médié par l'action d'une protéine GAP spécifique à la GTPase en question, facilitant l'hydrolyse du GTP en GDP et phosphate inorganique. Il est à noter que la plupart des GTPases sont également aptes à hydrolyser le GTP de façon indépendante au recrutement d'une GAP, quoique moins efficacement.

2.2 Régulation et modifications post-traductionnelles

Les Rabs sont d'abord synthétisées au réticulum endoplasmique pour ensuite être acheminées vers leurs membranes respectives (Hutagalung & Novick, 2011). Comme ce sont des protéines globulaires solubles, ces protéines doivent subir certaines modifications post-traductionnelles afin de s'associer à leurs membranes respectives (Shinde & Maddika,

2018). En effet, la geranylgeranylation des Rabs est une étape clé dans leur maturation et mène à l'ajout d'un groupement lipophile sur les cystéines terminales consensus de la protéine. Cette séquence consensus est conservée chez la famille des Rabs, quoique distincte chez les autres sous-familles de GTPases, lesquelles sont lipidées via d'autres types de chaînes aliphatiques (Shinde & Maddika, 2018). Cette étape de lipidation est jumelée à celle de transport jusqu'à la membrane cible de la Rab. La GTPase fraîchement synthétisée s'associe rapidement à la GeranylGeranyl Transférase (GGTase) ainsi qu'à la Rab Escort Protein (REP) qui permettent respectivement la lipidation et la solubilisation de la Rab modifiée (Zhen & Stenmark, 2015). Ce complexe est ainsi acheminé jusqu'à la membrane donneuse où la Rab sera libérée et pourra s'associer à celle-ci pour effectuer sa fonction.

2.3 Mutants

À la lumière du potentiel oncogénique de Ras, les chercheurs furent capables d'identifier certaines mutations récurrentes chez les patients atteints de cancers Ras-dépendants. En effet, certaines mutations faux-sens aux codons 12, 13 et 61 de la petite GTPase Ras mènent à la formation d'une protéine constitutivement active « GTP-locked » (Hobbs et al., 2016). Vu la grande homologie entre les différentes sous-familles des petites GTPases, ces mutations activatrices sont également transposables aux autres membres, dans un sens où le design de mutants constitutivement actifs, ou de dominants négatifs de la petite GTPases à l'étude sont réalisables et s'avèrent être un outil de recherche important (Rojas et al., 2012).

2.4 Structure et domaines

Rab4 est une protéine dont il existe deux isoformes. Rab4A et Rab4B sont encodées par les gènes RAB4A et RAB4B, respectivement. Rab4A est la forme la plus exprimée dans la plupart des types cellulaires et diffère de son homologue par quelques acides aminés seulement (Papatheodorou et al., 2018). La signification biologique que présentent ces différences entre Rab4A et Rab4B sont encore nébuleuses à ce jour, malgré l'identification de Rab4B comme ayant un rôle important et distinct de son homologue dans le transport du récepteur GLUT4 chez les adipocytes (Kaddai et al., 2009).

De manière semblable à la plupart des petites GTPases, Rab4 possède des domaines protéiques permettant son fonctionnement en tant qu'interrupteur moléculaire. Comme tous les membres de la Superfamille Ras, Rab4 présente un motif de Rossmann, caractérisé par une série de brins beta parallèles formant un feuillet beta central (Marcus & Mattos, 2020) (Figure 4). Celui-ci est pris en tenaille entre plusieurs hélices alpha pour ainsi former une protéine globulaire. Cette partie centrale de la protéine est appelée domaine G (Stouten et al., 1993). En plus de posséder une affinité pour l'ion magnésium divalent (Mg^{2+}), Rab4 présente également 3 domaines dont la structure varie fortement en réponse à l'échange ou la liaison du GDP/GTP (Stenmark & Olkkonen, 2001). Ces domaines sont les suivants et sont cruciaux pour l'activité GTPasique de la protéine :

La boucle P, ou boucle de Walker, est une séquence d'acides aminés retrouvée fréquemment chez les protéines liant le GTP ou l'ATP (Hanson & Whiteheart, 2005). En effet, cette boucle adopte une conformation qui entraîne la liaison du phosphate β du GTP dans la pochette catalytique, ce qui permet la stabilisation de celui-ci (Mercier et al., 2015).

Les domaines Switch I et Switch II sont des domaines assez mobiles présentant une affinité pour le phosphate γ du GTP (Pylypenko et al., 2018). Il est important de mentionner que le nucléotide (GDP ou GTP) doit lier le Mg^{2+} afin de pouvoir s'associer à Rab4. En effet, l'ion Mg^{2+} est un cofacteur et est coordonné avec des molécules d'eau afin de favoriser la liaison du nucléotide à la protéine (Gabe Lee et al., 2009). La conformation assumée par les domaines Switch I et II est dépendante de la présence du GDP ou du GTP dans la pochette catalytique. Sous la forme active, les domaines Switch sont liés plus fortement aux $GTP-Mg^{2+}$ et sont donc contraints dans une conformation plus rigide. Lorsque $GDP-Mg^{2+}$ liés, ces domaines se relâchent et deviennent plus mobiles (Pylypenko et al., 2018). Les Figures 4, 5 et 6 sont de différentes représentations de la structure cristallographique de Rab4 obtenue sur PDB (2BME). La coloration des segments présentés a été réalisée à l'aide du logiciel PyMol.

C'est ce cycle d'activation/inactivation (Figure 3), basé sur l'affinité différentielle que ces trois principaux domaines possèdent envers le GDP/GTP, qui mène aux changements conformationnels essentiels au rôle de cette famille de protéine.

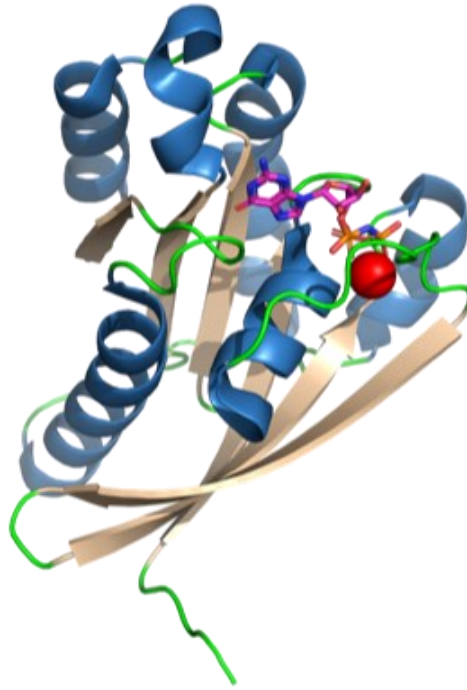


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la petite GTPase Rab4. Représentation ruban des structures secondaires : les hélices alpha (rouge) et les feuillets beta (beige). L'ion magnésium divalent est représenté en rouge et l'analogue non-hydrolysable du GTP, le GppNHp, est présent dans le site actif.



Figure 5 : Disposition des domaines Switch I, SwitchII et P-loop. Ceux-ci sont représentés en bleu, cyan et magenta, respectivement. L'ion magnésium divalent est représenté en rouge et l'analogue non-hydrolysable du GTP, le GppNHp, est présent dans le site actif.

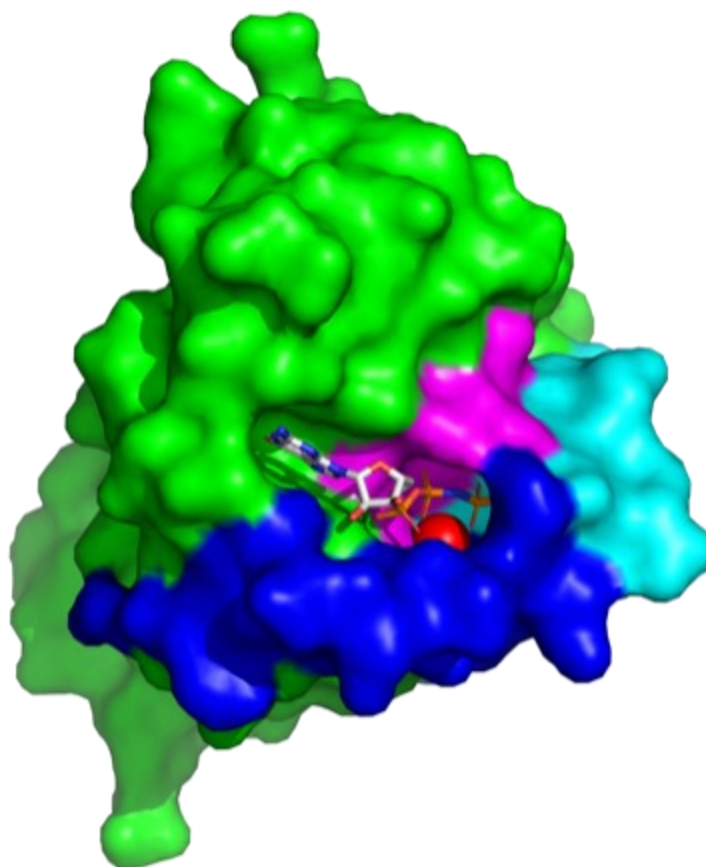


Figure 6 : Représentation de la surface occupée par les atomes de Rab4. Les domaines Switch I, SwitchII et P-loop représentés en bleu, cyan et magenta, respectivement. L'ion magnésium divalent est représenté en rouge et l'analogue non-hydrolysable du GTP, le GppNHp, est présent dans le site actif.

3 FONCTION ET ÉVOLUTION

3.1 Rabs et organites

Tel qu'énoncé précédemment, il existe plus de 60 membres de la famille des Rabs humaines. La plupart de ces Rabs ont été étudiées et furent associées aux compartiments respectifs dont elles contrôlent le vas-et-viens vésiculaire (Hutagalung & Novick, 2011). La Figure 7 permet de souligner l'importance qu'ont ces protéines dans le transport entre toutes les organites et la membrane plasmique.

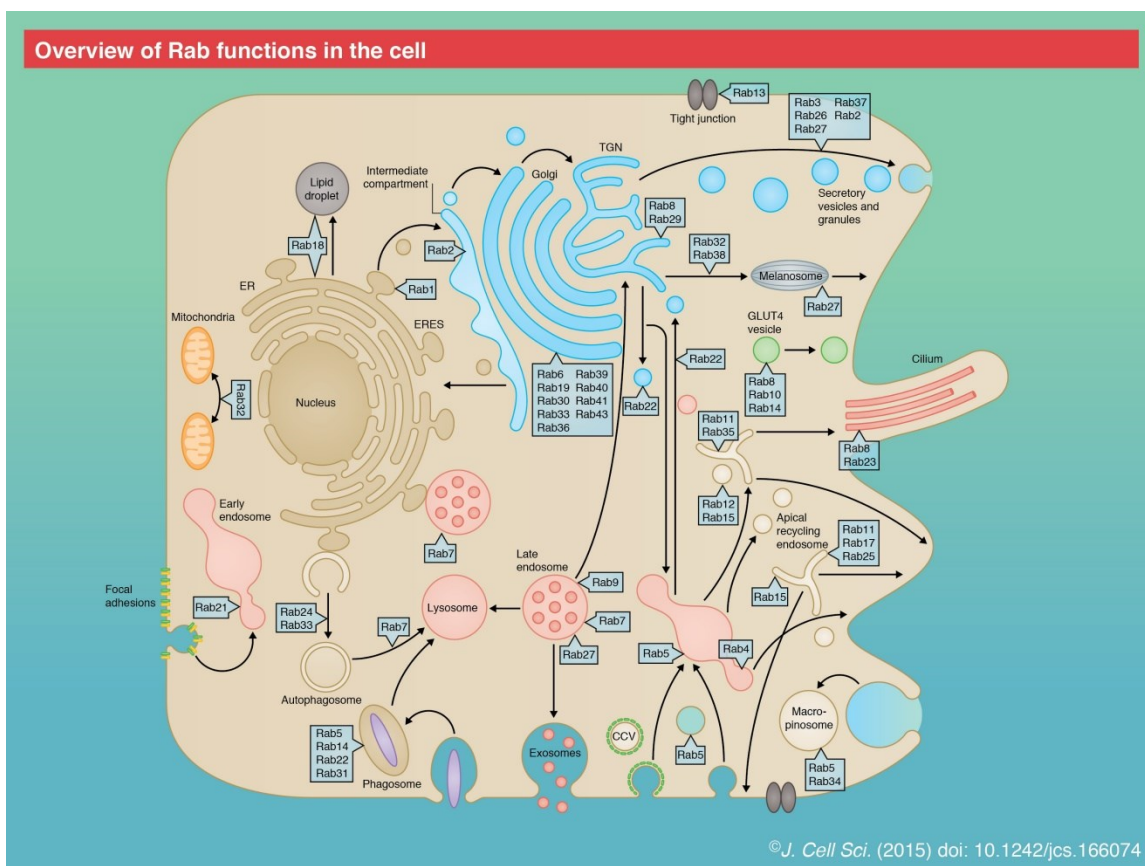


Figure 7 : Survol des fonctions cellulaires des Rabs. Représentation des différents Rabs et des organites auxquelles elles sont associées. Adapté de (Zhen & Stenmark, 2015) avec permission

Les protéines Rabs, bien qu'ayant évolué différemment d'espèce en espèce, sont conservées et retrouvées chez la totalité des ancêtres eucaryotes (Rojas et al., 2012). Des efforts ont été réalisés pour mieux comprendre les déterminants de l'évolution de ces GTPases. L'analyse évolutive de celles-ci permet d'établir le surgissement d'un ancêtre commun dénommé LECA (last eukaryotic common ancestor) à partir duquel les différentes Rabs ont évolué chez les supergroupes d'eucaryotes distincts. Ces supergroupes représentent les maintes espèces actuelles dérivées d'un ancêtre commun. Ceux-ci sont regroupés et associés ensemble via des analyses évolutives variées et sont importants à prendre en compte lorsqu'on analyse la diversification protéique résultante de l'évolution. Il est théorisé que la grande diversité des organites humaines actuelles sont originaires d'un eucaryote ancestral ne possédant qu'un seul compartiment membranaire interne. À travers les générations, l'évolution et la spéciation, des événements de duplication génique, de

mutation et de spécialisation moléculaire qui en découlent seraient ainsi survenus. Ce phénomène itératif, jumelé à la coévolution du réseau protéique, aurait ainsi permis la diversification graduelle des différentes organites connues à ce jour, via l'apparition de nouvelles voies biologiques espèces-spécifiques, lesquelles auraient conféré un avantage évolutif aux espèces les ayant développées (Brighouse et al., 2010a). L'apparition graduelle, à travers l'évolution, de nouveaux organites spécialisés a ainsi permis la diversification des Rabs et la survenue de l'identité vésiculaire, requise pour le maintien structurel de cette pléiade d'organites. Le transit de vésicules entre chacune d'elles devant être finement régulé pour maintenir l'homéostasie cellulaire, la nature a mené à l'évolution de complexes protéiques pouvant contrôler le transfert de vésicules entre les organites ainsi que l'activation et l'inactivation séquentielle des différentes Rab qui prennent part à ce processus (Brighouse et al., 2010a).

3.1.1 Couplage fonctionnel

Tel qu'énoncé précédemment, les Rabs s'associent aux membranes et contribuent à l'identité membranaire. Via leur activation et leur interaction avec une panoplie d'autres protéines, ces dernières permettent le transport entre les divers compartiments cellulaires (Barr, 2013). Cette capacité qu'elles ont à performer ce va-et-vient soulève plusieurs questions d'ordre mécanistiques. Comment sont-elles ciblées vers le bon compartiment? Comment sont-elles réacheminées à leur compartiment d'origine? Comment sont régulés les niveaux d'activation de chacune des Rabs? Comment sont recrutées les GAPs et les GEFs d'une façon spatiotemporelle appropriée dans un contexte cellulaire donné? Les efforts chevronnés des chercheurs ont permis d'identifier plusieurs mécanismes pouvant répondre à ces questions. Dans la plupart des cas, le maintien de l'identité des vésicules est assuré par le recrutement de la GEF de la GTPase à la membrane donneuse par la GTPase précédente ayant atteint sa membrane acceptrice. Le même principe est appliqué aux GAPs. Ceci permet une activation et une désactivation locale contrôlée, maintenant ainsi l'identité de l'organite tout en permettant le transport directionnel de vésicules (Brighouse et al., 2010b)

3.1.2 Recyclage

Tel que présenté précédemment, la cellule possède une multitude de compartiments cellulaires délimités par des membranes lipidiques à diverses compositions. Parmi ces

compartiments compte l'un des plus importants dans le contexte de mon projet de recherche, l'endosome précoce. Cet organe est responsable du tri des cargos internalisés vers deux voies principales : la dégradation lysosomale ou le recyclage vers la membrane plasmique (Jovic et al., 2010). La GTPase mise à l'avant-plan dans mon projet de recherche est impliquée dans ce dernier (Figure 7). En effet, Rab4, la GTPase clé de ce processus, agit de concert avec une panoplie de protéines afin de réacheminer les cargos solubles dans le milieu extracellulaire, et d'exposer les protéines membranaires préalablement internalisées à la surface de la cellule (Grant & Donaldson, 2009). La fine régulation nécessaire à la discrimination entre une protéine destinée au recyclage ou à la dégradation lysosomale est régie par l'association entre les Rabs impliquées et leurs partenaires d'interaction, présentant généralement une affinité pour la forme GTP-liée de la Rab en question.

3.2 Partenaires d'interaction connus

Afin d'accomplir sa fonction, Rab4 nécessite un réseau d'interacteurs régulant les étapes clés du recyclage. Qu'il s'agisse de protéines adaptatrices, de kinases, de phosphatases ou encore de GEFs, de GAPs et de « GDP dissociation inhibitors » (GDI), Rab4 devra interagir avec celles-ci afin de mener à bien chacune des étapes du transport de l'endosome précoce vers la membrane plasmique (Grant & Donaldson, 2009). Les interacteurs protéiques ayant une préférence pour la forme active de la Rab (GTP-liée) sont classiquement désignés comme étant des « effecteurs ».

Un effecteur crucial pour Rab4 est Rabenosyn-5 (RBSN, ZFYVE20). En plus de lier la Rab4 ou la Rab5 activée, RBSN comprend un domaine FYVE possédant une affinité pour les membranes lipidiques à forte concentration en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) (Navaroli et al., 2012). Comme la présence de PI3P à la surface de l'endosome précoce est une de ses caractéristiques principales (Marat & Haucke, 2016), son association à celle-ci est favorisée. En plus d'avoir des sites liaison pour le PI3P, Rab4 et même Rab5, Rabenosyn-5 possède également un domaine de liaison aux protéines avec domaine EH (EHD) (Naslavsky et al., 2004), elles-mêmes impliquées dans le remodelage membranaire via leur association au complexe du rétromère (Seaman, 2012).

Rabaptin5 (RABEP1) est également une protéine pouvant interagir avec la forme GTP-liée de Rab4. En plus d'avoir un site de liaison à Rab4, elle présente également un site de liaison à Rab5 ainsi que pour sa GEF, Rabex5. Ainsi, lorsque le complexe RABEP1-Rabex 5 est recruté chez les vésicules Rab4-GTP positives, celui-ci mène à l'activation de Rab5 et à la maturation de l'endosome précoce (Kälin et al., 2015; Vitale et al., 1998). Ce mécanisme d'activation est commun parmi les Rabs et a évolué afin de permettre une régulation plus efficace de l'endosome précoce (Brighthouse et al., 2010b).

Les travaux précédemment publiés au laboratoire ont également démontré l'existence d'une nouvelle protéine pouvant interagir avec Rab4 (Binda et al., 2014, 2019). En effet, la Prostaglandine Synthase de type Lipocaline (L-PGDS) coopère avec Rab4 dans le recyclage du récepteur couplé aux protéines G DP1. L'interaction directe Rab4/L-PGDS a été confirmée via la réalisation de pulldowns protéiques. Ceux-ci ont également permis de mieux caractériser la nature de cette interaction. Il a été démontré que L-PGDS possède une capacité à promouvoir le chargement en GTP de Rab4, et ainsi son activation. Ces travaux ont permis non seulement de mettre en évidence l'interaction directe entre Rab4 et L-PGDS, mais également de proposer un rôle potentiel de la prostaglandine synthase dans l'activation et/ou le recrutement de Rab4. En tout et partout, la protéine L-PGDS s'avère être une protéine intéressante qui, via son interaction directe avec Rab4, active la GTPase.

4 EXPRESSION ET PATHOLOGIE

4.1 Expression tissulaire

Rab4A est exprimée dans la plupart des tissus, et présente donc peu de spécificité d'expression (Papatheodorou et al., 2018). Il en est de même pour son expression cérébrale, laquelle est disséminée dans la plupart des différentes sous-structures du cerveau (Sjöstedt et al., 2020). Ces données démontrent que l'expression de l'ARN messager de Rab4A semble ubiquitaire. Cependant, chez les cellules sanguines, les niveaux d'ARN messagers dénombrés sont beaucoup plus élevés chez les granulocytes que chez les autres types cellulaires (Uhlen et al., 2019). Le profil d'expression de Rab4A est assez semblable à celui de son homologue Rab4B, à quelques exceptions près. Ce dernier est également retrouvé

dans la plupart des tissus, mais les niveaux d'ARN messagers sont prédominants dans le cerveau, chez les cellules sanguines et chez les syncytiotrophoblastes (Uhlen et al., 2019).

4.2 Rabs et pathologies associées

Les Rabs et leurs dysfonctionnements sont à l'origine d'une multitude de pathologies, variant d'intensité selon la Rab affectée et le rôle physiologique de celle-ci. Par exemple, le dérèglement de Rab27a est à l'origine du syndrome de Griscelli, caractérisé par l'albinisme et l'immunodéficience des personnes atteintes (Ménasché et al., 2000). De façon semblable, des mutations spécifiques chez la petite GTPase Rab7 mènent à l'émergence de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, caractérisée par une ulcéromutilation neuropathique des extrémités (Verhoeven et al., 2003). Les rôles respectifs de ces deux GTPases peuvent nous éclairer sur leur physiopathologie. Rab27 est impliquée dans l'exocytose des granules cytotoxiques des cellules du système immunitaire, tout en étant un régulateur clé du mélanosome, responsable de la pigmentation des cellules (Tolmachova et al., 2004; Yoshida-Amano et al., 2012). Son dérèglement mène ainsi au syndrome d'hématophagie et d'albinisme observés chez les patients atteints du syndrome de Griscelli. Rab7 est impliquée dans une pléthore de processus, dont le trafic entre le lysosome et l'endosome. Son dérèglement mène, entre autres, à la dégénérescence des neurones périphériques (Guerra & Bucci, 2016). Ces deux dysfonctionnements des Rabs ne sont que des cas de figure. Il en existe plusieurs autres, ce qui souligne leur importance dans divers processus cellulaires.

4.2.1 CSTN et invadosomes

Des travaux récemment publiés ont mis en évidence le rôle important des petites GTPases Rab4, Rab5 et de leur effecteur Rabenosyn-5 dans le développement et la métastase de certains cancers (Frittoli et al., 2014). De concert, ces trois protéines et leurs interacteurs peuvent soutenir un cycle de recyclage de métalloprotéases et de β -intégrines à la surface cellulaire (Castro-Castro et al., 2016). Ce mécanisme, sélectionné et amplifié chez certaines souches cancéreuses, permet une dégradation de la matrice extracellulaire qui maintient normalement l'intégrité structurelle des tissus (Frittoli et al., 2014). Le cycle d'acheminement des métalloprotéases à la membrane plasmique ainsi que son recyclage subséquent forment des structures spécialisées, dénommées invadosomes. Bien que certains types cellulaires exploitent cette formation à bon escient (monocytes,

macrophages, ostéoclastes, etc.), cette capacité de dégrader les matrices extracellulaires s'avère être une caractéristique prisée et sélectionnée par les tumeurs cherchant à se disséminer et peupler d'autres parties du corps (Linder et al., 2011). En plus de favoriser le recyclage des métalloprotéinases de matrices de type 1 (MT1-MMP), il a été démontré que ces cycles d'endo/exocytose permettent l'acheminement de la β 3-intégrine à la membrane plasmique (Frittoli et al., 2014). Cette protéine permet ainsi le recrutement de c-Met, le récepteur du « hepatocyte growth factor ». L'interaction intégrine/c-Met mène à la formation localisée d'un milieu invasif permettant la chimiotaxie cellulaire des cellules tumorales (Chan et al., 2006).

C'est en se penchant sur l'importance physiologique et pathologique de Rab4 que l'on comprend l'énorme potentiel que cette protéine présente en tant que cible pharmacologique. Tel qu'abordé ci-haut, sa surexpression dans divers cancers est en partie tributaire à sa capacité à favoriser l'invasion de ceux-ci dans les tissus avoisinants. À la lumière de ses mécanismes régulateurs, la conception d'une molécule pouvant altérer les fonctions de Rab4 s'avère être une avenue possible et intéressante. Le design rationnel d'une molécule affine et le raffinement de ses propriétés physicochimiques pourraient être les premiers pas vers le développement d'un agent thérapeutique innovateur. Les sections suivantes présentent les approches qui ont été prises pour en arriver à ces fins.

QUESTION PRINCIPALE

Est-ce possible d'exploiter les propriétés physicochimiques d'un partenaire d'interaction de Rab4 afin de créer des molécules altérant son activité?

BUT DE L'ÉTUDE

Créer une librairie de peptides mimétiques de partenaires de Rab4 afin de cribler ceux-ci et d'évaluer leur activité sur Rab4.

HYPOTHÈSE

Les peptides mimétiques de L-PGDS, partenaire d'interaction connu de Rab4, permettent d'altérer l'activité de Rab4 et de servir de référence pour le design rationnel d'une multitude de composés aux profils pharmacologiques plus appropriés.

OBJECTIFS

- Synthétiser une gamme de peptides dérivés de la séquence de L-PGDS
- Évaluer l'impact qu'ont ces peptides sur le chargement en GTP de Rab4
- Développer des outils pour mieux évaluer le chargement nucléotidique de Rab4
- Identifier de nouveaux partenaires protéiques potentiels de Rab4

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Synthèse peptidique sur phase solide

Si non spécifié, toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'azote. Tous les solvants utilisés étaient de qualité chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et furent utilisés sans purification supplémentaire. Les réactions sensibles à l'eau ont été faites dans des solvants anhydres. La résine TentaGel S RAM (0.22 mmol g^{-1}) fut obtenue de la compagnie Rapp Polymere (Tübingen, Germany). Tous les réactifs de couplage et les dérivés d'acides aminés ont été achetés chez ChemImpex International (Wood Dale, IL). La pipéridine et le N-méthylpyrrolidinone ont été obtenus chez A&C American Chemicals Ltd (Saint-Laurent, Québec, Canada). Tous les autres réactifs furent commandés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). L'analyse par chromatographie liquide analytique couplée à un spectromètre de masse (UPLC-MS) a été réalisée sur le module de séparation AQUITY H-Class de Waters (Milford, Massachusetts, USA), couplé au spectromètre de masse SQD2 de Waters, muni d'une colonne analytique BEH C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 50 \text{ mm}$). La CLHP préparatoire a été accomplie à l'aide du module 2535 de Waters avec une colonne de séparation ACE C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 21.2 \text{ mm}$) (Canadian Life Science, Peterborough, Ontario, Canada).

Les synthèses ont été faites sur un système automatisé en utilisant la résine Tentagel S RAM. La résine fut préalablement insérée dans les cuves de réaction sur synthétiseur Symphony-X (Gyros Protein Technologies, Tucson, AZ). Les étapes de déprotection ont été effectuées en utilisant de la pipéridine 20% dans du N,N-diméthylformamide. Les acides aminés Fmoc furent ajoutés en excès quintuple avec HATU en présence de DIPEA. Une fois que tous les couplages furent complétés et que le Fmoc terminal eut été retiré, les peptides nouvellement formés furent clivés du support solide à l'aide d'un mélange de TFA/H₂O/TIPS/EDT (92.5:2.5:2.5:2.5, v/v/v/v) pendant une durée proportionnelle à la teneur en arginine du peptide ($2\text{h}30 + 30\text{min} \times \text{xR}$) jusqu'à concurrence de 5h. Le mélange fut ensuite filtré et précipité dans l'éther diéthylique froid. Les peptides bruts ainsi précipités furent centrifugés et la couche d'éther retirée par décantation. Les peptides bruts furent ensuite dissouts dans un mélange d'eau et d'acétonitrile dont la proportion est

préalablement déterminée selon la polarité prédite du peptide. Une fois dissouts, les peptides furent filtrés, dilués jusqu'à concurrence de 10 mL et lyophilisés. Ceux-ci furent ensuite purifiés à l'aide d'un CLHP préparatoire. Les fractions contenant le peptide purifié furent ensuite combinées. L'identité et la pureté des peptides furent confirmés par UPLC-MS.

2. Expression et purification de protéines recombinantes

Les protéines recombinantes avec étiquette 6xHis ont été produites avec le plasmide d'expression bactérienne pET3a (Novagen, Oakville, Ontario, Canada) transformé dans la souche *Escherichia coli* C41 (DE3) OverexpressTM (Avidis, Saint-Beauzire, France). À la suite d'une transformation avec choc thermique et à la croissance de ces bactéries ayant acquis la résistance à l'ampicilline conférée par le vecteur pET3a, celles-ci furent incubées dans le milieu « Lysogeny Broth » LB jusqu'à l'obtention d'une culture de 0.5 DO. Cette culture fut mise sur glace dans le but de cesser la croissance des bactéries. Leur incubation pendant 16h à 4°C avec agitation en présence de 2% d'EtOH et de 0.4 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) leur permet de transcrire et de traduire la protéine dont la séquence d'ADN a été incluse dans le vecteur pET3a par génie génétique, engendrant l'expression de celle-ci dans les bactéries *E. coli* C41 présentes dans le milieu LB. Le milieu est ensuite retiré à la suite d'une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes. Les bactéries ont ensuite été suspendues à l'aide d'un tampon de lyse (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazole, Sarkosyl 1% m/v, pH 8.0) auquel un cocktail d'inhibiteur de protéases a été supplémenté (10 μ m chymostatin, 10 μ m leupeptin, 9 μ m antipain, and 9 μ m pepstatin, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Cette suspension est ensuite incubée avec 1 mg/mL de lysozyme (Sigma) afin de faciliter la lyse des bactéries. Une sonication est ensuite effectuée, sur glace. La fraction non-soluble fut retirée par centrifugation à 4°C à 13000 rpm pour une durée de 25 minutes. La fraction soluble est ensuite combinée avec des billes Ni-NTA (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada) possédant une affinité pour l'étiquette 6xHis, puis incubée avec agitation pendant 30 minutes à 4°C pour permettre l'association des protéines-His6 à la résine Ni-NTA. Celles-ci furent ensuite lavées suite à l'insertion des billes dans une colonne à filtre de 20 cm. Trois lavages ont été effectués à l'aide du tampon de lavage (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazole, pH 8.0). Les protéines purifiées ont ensuite été éluées des billes Ni-NTA par

compétition avec un tampon à haute teneur en imidazole (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazole, pH 8.0). Afin d'obtenir une protéine purifiée dans le tampon voulu, cet éluat fut chargé et concentré sur une colonne de changement de tampon Amicon 15k (Millipore), de façon conforme à la fiche du fabricant. Le tampon final utilisé est dépendant de l'utilité ultérieure prévue pour ce lot de protéine-His6.

Les protéines fusion-Glutathione S-transferase (GST) ont été produites à l'aide du vecteur d'expression bactérienne pGEX4T1 (Amersham Biosciences, Amersham, Buckinghamshire, U.K.), transformé dans la même souche bactérienne décrite précédemment. Suite à l'induction des bactéries, à leur croissance et à leur centrifugation afin de retirer le milieu LB, tel que décrit ci-haut, celle-ci furent suspendues dans le tampon A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 10% v/v glycérol, 0.5% v/v IGEPAL) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteur de protéases. Les étapes de lyse au lysozyme et la sonication furent effectuées de façon identique à ce qui est décrit ci-haut. Le surnageant récolté suite à la centrifugation a été ajouté à des billes Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Amersham, Buckinghamshire, U.K.) préalablement bloquées avec 10 mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), puis lavées avec le tampon A. Suite à 1h d'incubation du surnageant avec les billes, celles-ci furent lavées 5 fois avec le tampon A.

Les protéines purifiées obtenues furent dosées via une migration et une coloration au bleu de Coomassie sur gel 10% SDS-polyacrylamide, en comparant leur concentration à celle de standards de BSA de concentrations connues.

3. Pulldown par affinité

Les pulldowns ont été réalisés avec les protéines Rab4-His6 et RABEP1-GST, préalablement purifiées tel que décrit ci-haut. Ces protéines ont été combinés à raison de 1 µM chacune dans un tampon de liaison (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 10% v/v glycérol, 0.5% v/v IGEPAL, 1mM DTT). Après 1h d'incubation à 4°C, les billes contenues dans cette réaction de liaison ont été lavées trois fois avec le tampon de liaison. Celles-ci furent ensuite supplémentées d'un tampon SDS. À la suite de cette étape, les échantillons ont été dénaturés, chargés sur gels d'acrylamide, migrés afin de séparer les protéines qu'ils contiennent par poids moléculaire, puis transférés sur

membrane de nitrocellulose. Suite à l'incubation de ces membranes dans une solution contenant des anticorps reconnaissant l'étiquette d'intérêt (His₆ ou GST), les membranes sont lavées pour enlever l'excédent d'anticorps non lié. Celles-ci sont ensuite révélées par chimioluminescence grâce à l'ajout séquentiel d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase, puis d'une solution de révélation contenant du peroxyde d'hydrogène et du luminol. Sous l'action de la peroxydase, le peroxyde présent localement participe à une réaction de réduction ($2 \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$) et contribue à la formation d'un milieu oxydant. Ce milieu oxydant est localisé aux endroits sur la membrane où les anticorps ont lié leurs antigènes, en l'occurrence l'étiquette His₆ ou GST. L'oxydation localisée du luminol forme alors des intermédiaires énergétiquement riches qui vont par la suite se désintégrer et émettre un photon. Un film est ensuite appliqué sur ces membranes et celui-ci est révélé dans une chambre noire. Cette technique permet de détecter visuellement des bandes, d'intensité proportionnelle à la concentration protéique, correspondant aux protéines ciblées par les anticorps.

4. Essais de chargement en GTPγS

Les expériences de chargement en GTPγS ont été réalisées de façon semblable à ce qui est stipulé dans l'article d'un collaborateur (Jean et al., 2012). La Rab4-His₆ à 10 μM fut incubée dans un tampon de chargement en GDP (40 μM GDP, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) à 30°C pendant 10 minutes afin de charger complètement Rab4 en GDP. En vue de stabiliser cet état, 10 mM de MgCl₂ est ajouté par la suite. Les réactions de chargement en GTPγS ont été effectuées à température pièce via l'ajout du tampon d'échange (0.5 mg/mL BSA, 5 μM GTPγS, 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), avec ou sans l'ajout de 3 μM de L-PGDS-His₆ ou du peptide utilisé dans un volume total de 130 μL pour un temps déterminé. Après cette incubation, 70 μL de tampon de lavage glacial (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂) ont été ajoutés en vue d'arrêter la réaction. Les pulldowns par affinité à la RABEP1-GST ont ensuite été effectués pour une période de 2 h. Les billes de glutathion-sépharose ont été lavées trois fois avec le tampon de lavage glacial et furent dénaturées puis chargées sur gel. À la suite de leur migration, les protéines présentes dans le gel furent

transférées sur une membrane de nitrocellulose permettant leur identification subséquente avec des anticorps spécifiques.

5. RMN de protéine en solution

Les expériences RMN ont été effectuées à 25°C dans un spectromètre RMN Bruker Advance III HD (Bruker, Billerica, Massachusetts, États-Unis) muni d'une probe de résonance triple PA-TXI 600S3. Les spectres bidimensionnels HSQC 1H15N ont été acquis avec 2048 points dans la dimension F2 (hydrogène 1) et avec 256 dans la dimension F1 (azote 13). Les données recueillies furent analysées en utilisant le logiciel Topspin 3.5 et le CCPNmr Analysis 2.4 (University of Leicester, Leicester, U.K.). L'assignation des spectres tridimensionnels (non-présentés) a été faite suite à l'acquisition des séquences de pulsations CBCA(CO)NH, CCC(CO)NH et HNCACB.

6. Culture cellulaire

Les cellules HEK293 furent cultivées à 37°C en présence de 5% CO₂ dans le milieu modifié Dulbecco Eagle (DMEM) (Invitrogen) auquel 10% de sérum bovin fœtal (Gibco, Thermo Fisher, Saint-Laurent, Québec, Canada) fut supplémenté. Les transfections transitoires ont été réalisées à 50% de confluence en utilisant l'agent de transfection TransIT-LT1 (Mirus, Madison, Wisconsin, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant. La quantité totale d'ADN transfecté fut normalisée entre chaque condition via l'ajout de vecteur pcDNA3 vide.

7. Immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse (IP-MS)

Les immunoprécipitations furent réalisées avec des anticorps monoclonaux anti-FLAG M2 de souris, immobilisés sur billes magnétiques. L'analyse LC-MS/MS subséquente fut réalisée en considérant l'enrichissement de l'intensité des peptides détectés par rapport au contrôle négatif pcDNA3. Un enrichissement supérieur à 1.5 nous permet de considérer la protéine à l'étude comme un interacteur protéique potentiel. La liste de ces protéines enrichies fut ensuite triée plus subjectivement en vue d'identifier des protéines dont les rôles pourraient suggérer un lien avec Rab4.

8. Anisotropie de fluorescence

Les expériences d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées à l'aide du spectrophotomètre F-2500 FL (Hitachi, Berkshire, U.K.). Un échantillon de Rab4-His6 préalablement purifié et dilué à 1 μ M dans un tampon approprié (200 mM NaCl, 50 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.4) dans un volume de 2 mL. Les filtres polariseurs ont été ajoutés puis l'un des deux a été incliné de 90° pour chaque mesure effectuée. Le peptide court 85-92 a été titré à 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M puis 200 μ M via l'ajout de petits volumes du peptide concentré à 2.5 mM dans le tampon présenté ci-haut. Deux mesures, résultantes de la rotation des filtres polariseurs, ont été prises pour chaque concentration. L'échantillon a été excité à 280 nm, puis l'émission de lumière fut récoltée par wavescan de 300 nm à 400 nm. Les valeurs d'émission maximale pour chaque axe (I_{\parallel} et I_{\perp}) ont ensuite été extraites puis traitées suivant la formule ci-dessous afin d'obtenir les valeurs d'anisotropie (r) :

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2I_{\perp})}$$

9. Essais de fluorescence intrinsèque des tryptophanes

Les expériences de fluorescence intrinsèque des tryptophanes ont toutes été réalisées à l'aide du lecteur de plaque à fluorescence Tecan Infinite © M1000 (Tecan, Männedorf, Suisse). Le logiciel utilisé est le Tecan i-control. Les réactions de chargement ont été effectuées dans le tampon Trp (200 mM NaCl, 50 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.4). La longueur d'onde d'excitation est de 297 nm et celle d'émission de 340 nm pour les cinétiques effectuées. La Rab4 préalablement purifiée était présente à raison de 1 μ M et les conditions contenant le peptide ou la L-PGDS complète avaient une concentration finale de 100 nM. Les expériences ont été réalisées dans un volume de 100 μ L, en triplicata, sur plaques 96-puits opaques adaptées pour la fluorescence (Corning Inc, NY, USA). Les cinétiques ont été débutées via l'ajout du $\text{GTP}\gamma\text{S}$ à 1 μ M final à l'aide d'une pipette multichannel, puis la lecture fut entamée. Les données récoltées furent analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (Version 7, GraphPad Software, Inc., USA, 2018). Une courbe de décroissance exponentielle fut ajustée aux données avec écart-type, puis les constantes de vitesse (k) en furent extraites.

RÉSULTATS

1. Synthèse de peptides dérivés de la séquence de L-PGDS

Afin d'identifier les acides aminés cruciaux à l'interaction entre L-PGDS et Rab4, une librairie de peptide dérivés de la séquence de LPGDS fut synthétisée. La séquence des différents peptides de première génération synthétisés relève de différents facteurs.

Premièrement, les deux peptides natifs sont extraits de la séquence de la protéine L-PGDS. Grâce à des pulldowns par affinité de Rab4 envers divers mutants de délétion de L-PGDS (Binda et al., 2019), la région d'interaction entre L-PGDS et Rab4 a pu être élucidée. Celle-ci fut ensuite sous-divisée en deux séquences : la séquence courte ainsi que la séquence longue (Figure 8). Ces choix de séquences sont justifiés par la structure secondaire qu'elles forment dans la protéine repliée. Ces brins β antiparallèles résultent en une protrusion à la surface de la protéine L-PGDS. Considérant que cette séquence est non seulement requise mais également suffisante pour lier Rab4 et que la L-PGDS permet l'activation de la GTPase *in vitro* (Binda et al., 2019), il fut théorisé que cette protrusion pourrait être responsable de l'effet activateur conféré par L-PGDS. De récentes études ont démontré qu'entraver l'activation d'une GTPase via la modulation d'un site allostérique est une stratégie envisageable (Yan & Theodorescu, 2018). La séquence longue a par la suite été laissée de côté pour causes de rendement de synthèse inférieur et de propriétés activatrices semblables à la séquence courte (Binda et al., 2019).

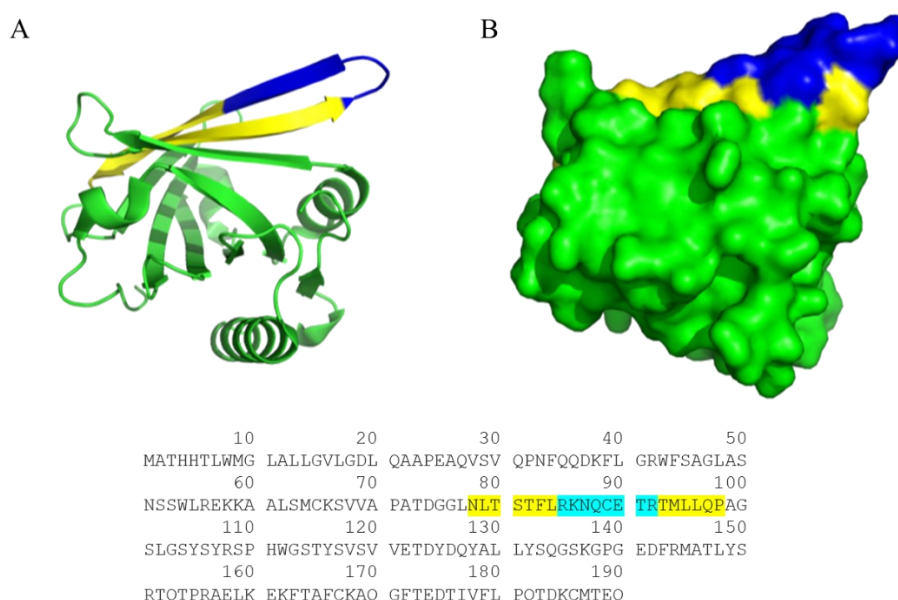


Figure 8 : Structure et séquence de L-PGDS. Représentation tridimensionnelle ruban (A) et surface (B) de la Prostaglandine D Synthase de type Lipocaline. Les peptides dérivés de sa séquence sont identifiés en jaune (séquence longue) et en bleu (séquence courte). Noter la disposition de type ‘hairpin’ de ces brins β antiparallèles, formant une protrusion à la surface de la protéine.

Deuxièmement, nous avons eu recours à la stratégie du scan alanine. Nous avons créé huit analogues du peptide court pour lesquels un acide aminé alanine remplace un acide aminé d’origine. Comme le résidu alanine prend très rarement part à la formation de liens protéine-protéine, cette stratégie permet de produire des peptides «manchots» pour un de leurs résidus, créant ainsi des peptides permettant l’élucidation des résidus qui sont impliqués dans l’association à la GTPase ainsi que dans son activation.

Troisièmement, des peptides auxquels nous avons ajouté la séquence TAT furent synthétisés. Cette suite d’acides aminés, provenant de la séquence d’une protéine virale, permet la pénétration à la membrane plasmique de composés dont les propriétés chimiques ne permettent normalement pas ce passage. Il est bien connu que les composés chargés ou trop polaires ne diffusent pas à travers la membrane plasmique. Nos peptides n’échappent pas à cette limitation. Dans l’espoir d’obtenir des peptides dont les propriétés chimiques permettent la réalisation d’essais *in cellulo*, nous avons procédé à la synthèse de certains peptides présentant cette séquence à propriétés pénétrantes en C-terminal.

Finalement, nous avons également synthétisé des peptides dont la séquence présente les mêmes acides aminés mais dont l'ordre est aléatoire. Ces peptides sont dénommés «scrambles» et font guise de contrôles négatifs dans certaines expériences ultérieures. Par curiosité, un peptide court avec une substitution C→S en position 89 a également été synthétisé. La cystéine et la sérine présentent des propriétés physicochimiques semblables. Cependant, contrairement à la sérine, la cystéine est assujettie à l'oxydation de son groupement thiol au long terme. Ceci mène à la formation d'espèces de thiol oxydé (acide sulfénique, sulfinique et sulfonique) lorsqu'en présence d'espèces réactives de l'oxygène, modifiant considérablement ses propriétés physicochimiques. Même si les peptides sont lyophilisés et entreposés à -80 C afin d'éviter ce type réaction secondaire, nous avons jugé pertinent de synthétiser un peptide bioisostère. Ci-dessous figurent un tableau récapitulatif des peptides synthétisés.

Tableau 1 : Peptides dérivés de la séquence de L-PGDS, synthétisés sur phase solide.

Séquence native	75-98	Ac- NLTSTFLRKNQCETRTMLLQP -NH ₂
	85-92	Ac- RKNQCETR -NH ₂
Alanine Scans	85-92	Ac- AKNQCETR -NH ₂
		Ac- RANQCETR -NH ₂
		Ac- RKAQCETR -NH ₂
		Ac- RKNACETR -NH ₂
		Ac- RKNQAETR -NH ₂
		Ac- RKNQCATR -NH ₂
		Ac- RKNQCEAR -NH ₂
		Ac- RKNQCETA -NH ₂
Bioisostères	85-92	Ac- RKNQSETR -NH ₂
Peptides-TAT	85-92	Ac - RKNQCETRRKKRRQRRR -NH ₂
		Ac - RKNQCATTRKKRRQRRR -NH ₂
Scrambles	75-98	Ac- LEQNLRLLRKMTPTTNTSCFQ -NH ₂
	85-92	Ac- QRCNTEKR -NH ₂
		Ac - KRTCRENQRKKRRQRRR – NH ₂

Ces peptides ont tous été synthétisés sur phase solide via des cycles d'ajout de l'acide aminé subséquent et de déprotection du N-terminal de l'acide aminé ajouté, ces deux étapes étant intercalées de plusieurs lavages de la résine. Les acides aminés utilisés pour la synthèse sont des dérivés modifiés chimiquement de sorte que leurs groupes réactifs sont mis à l'abri par des groupements protecteurs. Cette stratégie permet de préserver l'intégrité des groupement autrement réactifs de ces résidus tout au long de la synthèse et permet également de favoriser au maximum le couplage du lien peptidique durant la synthèse. Une fois la séquence complètement synthétisée, le peptide est clivé de la résine à l'aide d'un acide fort. Le clivage acide mène également à la déprotection des résidus préalablement inactifs par les réactions de couplages. La mixture de résine et d'acide contenant le peptide clivé est filtrée, précipitée dans l'éther, puis lyophilisée. Les peptides bruts ainsi obtenus sont ensuite purifiés par HPLC à l'aide d'un gradient eau/acétonitrile menant à la séparation, par polarité, des espèces chimiques présentes dans l'échantillon. La pureté des fractions contenant le peptide est analysée par UPLC-MS. Les fractions pures sont ensuite combinées, lyophilisées puis pesées. Les fiches de caractérisation et les formules topologiques des composés du Tableau 1 sont disponibles en Annexe 1. Certains de ces peptides seront utilisés dans les résultats subséquents à des fins de caractérisation de leur affinité, de leur propension à promouvoir ou entraver l'échange nucléotidique de la GTPase et de leur site de liaison sur Rab4.

2. Pulldown par affinité, compétition entre la L-PGDS et le peptide natif à séquence longue

Afin de confirmer que le peptide dérivé de la séquence longue s'associe bel et bien avec le même site d'interaction sur Rab4 que la L-PGDS complète, nous avons eu recours à de simples essais de compétition avec des protéines recombinantes. Les cDNAs codant pour la Rab4 avec une étiquette His₆ et la L-PGDS avec une étiquette GST ont été clonés dans des vecteurs d'expression bactérienne pRSETa et pGEX4T1, respectivement. Les constructions ont ensuite été transformées et induites dans des bactérie *E. coli* de souche C41, spécialisées dans l'expression protéique. Ces cultures bactériennes ayant exprimé les protéines d'intérêt ont par la suite été récoltées puis les protéines purifiées via des protocoles spécifiques à leurs étiquettes respectives.

L'association de ces protéines a été démontrée par la méthode de pulldown par affinité, couplée à un buvardage de type Western. Le pulldown consiste en l'incubation des deux protéines purifiées dans un tampon aqueux, l'une étant sur support solide. Une incubation suffisante permet à l'échantillon d'atteindre l'équilibre et aux protéines présentant une affinité l'une pour l'autre de s'associer. C'est ce qu'on constate dans la Figure 9. La rangée la plus basse nous renseigne sur les niveaux de Rab4-His₆ présents au début du pulldown dans chaque condition. Ces contrôles permettent de confirmer que les variations d'intensité d'association post-incubation sont bel et bien dues à une différence dans l'association des deux protéines, et non à une variation dans la quantité initiale de la protéine présente dans l'échantillon. La rangée du milieu nous informe sur les niveaux des protéines L-PGDS-GST et du contrôle négatif étiquette-GST présents dans chaque réaction de pulldown. Ceci nous permet de démontrer, de façon semblable à la rangée inférieure, que les niveaux de L-PGDS-GST sont égaux pour chaque réaction de pulldown. La première rangée est celle qui contient le plus d'information pertinente. Il s'agit des échantillons obtenus à la suite de l'incubation des deux protéines et des lavages de la phase solide sur laquelle les protéines sont associées. C'est dans cette rangée qu'on détecte une association entre les protéines de fusion GST et His₆.

Dans la première colonne de la Figure 9, on constate que notre contrôle étiquette-GST seul ne lie pas la protéine Rab4, tel qu'attendu. Dans la deuxième colonne, on démontre l'association entre la protéine L-PGDS-GST et la protéine Rab4-His₆, tel qu'observé précédemment (Binda et al., 2019). Pour la troisième colonne, la réaction de pull-down avait été supplémentée de 1 μ M du peptide contrôle «scramble» à séquence longue. Il ne semble pas y avoir d'effet sur l'association Rab4-His₆/L-PGDS-GST. La quatrième démontre la perte de l'association Rab4-His₆/L-PGDS-GST résultante de l'ajout du peptide natif à séquence longue dans la réaction de pull-down. De tels résultats suggèrent une compétition entre le peptide natif à séquence longue et la protéine L-PGDS complète pour le même site de liaison sur Rab4.

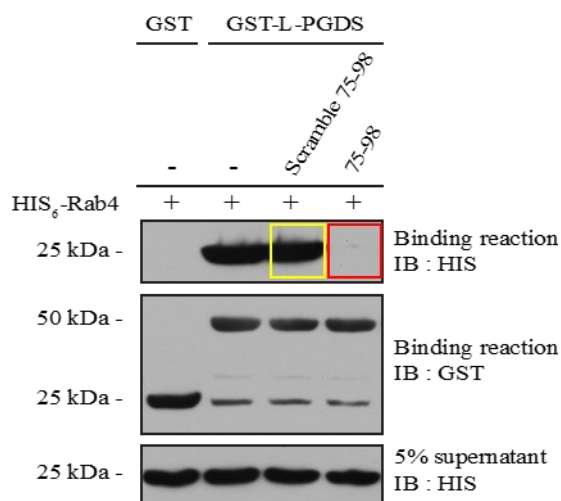


Figure 9 : Pulldown par affinité des protéines Rab4-His₆ et L-PGDS-GST, en absence et en présence d'un peptide dérivé de la séquence de L-PGDS. L'association entre les deux protéines recombinantes est observée. Celle-ci est affectée par l'ajout du peptide 75-98 dérivé de la séquence de L-PGDS, sans toutefois être affectée par un peptide contrôle.

3. Essais de chargement en GTP γ S, activation peptidique de Rab4

Tel qu'énoncé dans la description des résultats précédents, les essais de type pulldown permettent non seulement de qualifier l'interaction entre deux protéines, mais également de relativiser l'intensité de cette interaction entre différentes conditions. Cette technique est versatile dans un sens où l'expression et la purification de protéines recombinantes avec des étiquettes His₆ et GST est relativement facile et abordable. Dans ce troisième volet, des pulldowns par affinité sont également réalisés, ceux-ci étant conjugués à une autre méthode permettant le suivi du chargement en GTP de Rab4 à travers le temps. Cette technique, dénommée 'GTP γ S-loading', exploite l'affinité différentielle que possède Rab4-GTP pour sa protéine effectrice RABEP1. En effet, c'est RABEP1-GST qui est exprimée et purifiée afin de participer aux pulldowns, contrairement aux essais précédents. Suite à la préparation de Rab4-His₆ chargée en GDP, celle-ci est chargée dans une séquence de tubes de réaction. C'est ici que le chargement de la GTPase avec un analogue non hydrolysable du GTP est effectué. Pour chaque différente condition (Rab4 seule, avec les différents peptides ou avec la L-PGDS complète), le chargement en GTP γ S est amorcé pour un temps déterminé, puis arrêté via l'ajout d'un excès du cofacteur Mg²⁺. Ces réactions à l'arrêt sont ensuite utilisées pour effectuer les expériences de pulldown par affinité envers RABEP1-

GST. Les immunobuvardages qui en découlent permettent de constater une association grandissante entre Rab4-His₆ à RABEP1-GST à travers les différents temps d'arrêts effectués, ce qui est gage d'une activation de la protéine résultant de son chargement en GTP γ S. Les travaux antérieurs ont exploité cette technique pour caractériser l'effet conféré par la protéine L-PGDS complète dans l'activation de Rab4 (Binda et al., 2019).

Ayant comme objectif d'employer cette technique pour caractériser l'effet de nos peptides sur l'activation de Rab4 *in vitro*, nous avons procédé à la création de temps d'arrêt après 15 minutes de chargement en GTP γ S (Binda et al., 2019), facilité ou non par nos composés peptidiques. C'est ce qu'on peut observer dans la Figure 10(A). Il s'agit d'un graphique dont l'intensité des bandes provient de la quantification densitométrique des immunobuvardages réalisés à la suite des différents chargements en GTP γ S et des pull-down par affinité subséquents. La bande noire représente le chargement facilité par le peptide natif de séquence courte. Elle sert de référentiel pour comparer les niveaux d'activation de Rab4 en réponse aux divers peptides testés, l'axe des ordonnées étant exprimé en pourcentage de l'activation maximale conférée par le peptide natif court après 15 minutes de chargement en GTP γ S. La première bande blanche représente le contrôle négatif sans peptide, représentant le chargement intrinsèque en GTP γ S de Rab4. La deuxième bande blanche est un contrôle négatif avec le peptide 'scramble' pour lequel la séquence en acides aminés est aléatoire. Les huit bandes grises représentent les réactions de chargement en GTP γ S facilitées par les huit différents peptides 'alanine-scan' présentés dans la section 1 des résultats. Ces expériences ont été effectuées en triplicatas et les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Ce qu'on retient de la Figure 10(A), c'est que certains peptides avec substitution alanine, notamment les peptides Q88A, C89A et E90A, activent beaucoup moins Rab4 que le peptide natif court (85-92). Pour les composés Q88A et E90A, cette activation est comparable à celle conférée par le contrôle négatif avec peptide scramble. Ces résultats suggèrent que les acides aminés Q88, C89 et E90 semblent avoir un rôle dans l'activation peptidique de Rab4.

À la lumière de ces résultats, nous avons voulu approfondir nos connaissances quant à la capacité de ces peptides à entraver l'activation de Rab4 conférée par la protéine L-PGDS complète. C'est ce qui est observé dans la Figure 10(B). Il s'agit encore une fois d'un essai de chargement en GTP γ S de Rab4, couplé à un pull-down par affinité de celle-ci envers RABEP1-GST. La rangée inférieure du buvardage de type Western nous informe quant aux niveaux protéiques de RABEP1-GST dans chaque échantillon, lesquels semblent égaux. La rangée supérieure nous indique les niveaux d'association de Rab4-His₆ avec RABEP1-GST et contiennent l'information recherchée. La première colonne représente le chargement intrinsèque de Rab4 en GTP γ S, lequel est relativement faible. La deuxième colonne représente l'intensité d'association de Rab4 suite à son chargement facilité par la L-PGDS-His₆ complète. Les quatre dernières colonnes représentent les niveaux d'activation de Rab4 suite à leur chargement en GTP γ S en présence de la L-PGDS complète et des différents peptides indiqués plus haut. L'incubation concomitante du peptide scramble, de la L-PGDS et de la Rab4 ne pas affecter les niveaux d'activation conférés dans la condition sans peptide. Cependant, l'incubation concomitante des peptides Q88A, C89A ou E90A avec la L-PGDS et Rab4 mène à une diminution des taux d'activation de Rab4 à 15 minutes, démontrant un effet adverse de ces peptides sur le rythme de chargement en GTP γ S conféré par la L-PGDS. Le graphique sous-jacent est obtenu suite à une analyse densitométrique des bandes présentes dans l'immunobuvardage. L'expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, faute de disponibilité de certains des peptides et de temps, le diagramme à bandes a été ajouté en guise de repère visuel seulement.

En somme, ces résultats nous indiquent (A) que les peptides Q88A, C89A et E90A mènent à une activation de Rab4 moindre que celle conférée par le peptide natif court, et que ceux-ci, lorsqu'incubés avec la L-PGDS et Rab4 (B), semblent entraver l'effet activateur conféré par la L-PGDS seule.

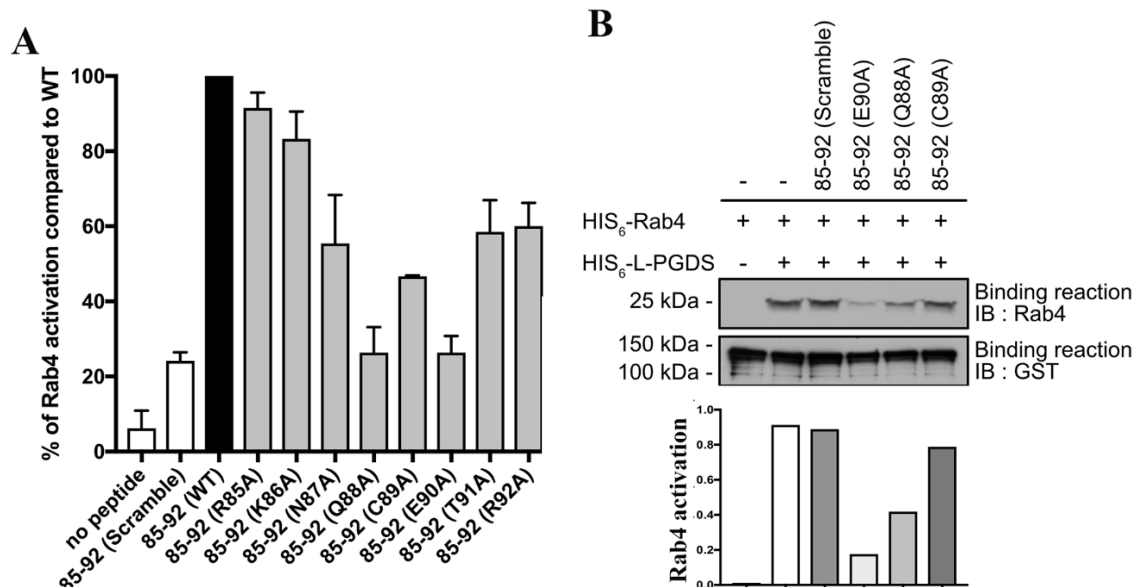


Figure 10 : Essais d'activation de Rab4 de type GTP γ S-loading. Quantification de l'effet des peptides sur le chargement en GTP γ S de Rab4. (A) Effet des différents peptides sur l'activation de Rab4, relatif à l'effet conféré par le peptide WT. (B) Caractérisation de l'effet des peptides sur le chargement de Rab4 facilité par la L-PGDS complète.

Malgré la versatilité des pulldowns par affinité et des expériences de chargement en GTP γ S, ces techniques présentent leurs lots d'inconvénients. En plus d'être longues et fastidieuses, la multiplicité des manipulations nécessaires à la réalisation de la technique mène inévitablement à une augmentation de l'incertitude de nos résultats. Étant donné que les niveaux d'activation de Rab4 sont quantifiés en vue de l'affinité différentielle que la protéine possède envers son effecteur RABEP1, il s'agit d'une mesure indirecte du chargement en GTP de la protéine. Afin de privilégier une méthode de quantification directe et plus rapide, nous avons eu recours à diverses autres techniques permettant de quantifier l'affinité des peptides ainsi que leur effet sur Rab4, lesquelles seront abordées dans les parties subséquentes.

4. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes de Rab4

La fluorescence est définie par la capacité qu'une molécule aromatique possède d'absorber un photon, menant au gain d'énergie de la molécule, puis à sa capacité d'émettre un photon d'énergie inférieure lors du retour de la molécule à son état basal. Des 20 acides aminés

naturels existant chez l'humain, trois possèdent des propriétés fluorescentes. Ces trois acides aminés sont la phénylalanine (F), la tyrosine (Y) et le tryptophane (W). Le tryptophane est de loin l'acide aminé le plus fluorescent, grâce à son rendement quantique (Q) et à son coefficient d'extinction molaire (ϵ) supérieurs. Étant donné que Rab4 possède deux tryptophanes dans sa séquence, nous avons exploré les avenues possibles dans le but de sonder l'état de chargement en GDP/GTP de la protéine. Une étude portant sur la fluorescence des tryptophanes de Rab5 a été publiée (Pan et al., 1995). Celle-ci démontre une variation des propriétés fluorescentes des tryptophanes de Rab5 en réponse à son état de chargement nucléotidique. Cette étude a permis de démontrer que, pour la même intensité et la même longueur d'onde d'excitation, la Rab5-GDP émettait davantage de fluorescence que sa contrepartie Rab5-GTP γ S. Voulant adapter et perfectionner cette technique, nous avons procédé à la mise sur pied d'un protocole permettant d'évaluer la fluorescence des tryptophanes de Rab4 en plaque 96-puits.

Ci-dessous figurent les profils de fluorescence de la Rab4-GDP et de la Rab4-GTP γ S. Dans la Figure 11, on observe en bleu, le profil de fluorescence de Rab4-GDP suite à une excitation à 290 nm, longueur d'onde permettant l'excitation des tryptophanes de sa séquence. En orange figure le profil de fluorescence de la Rab4-GDP à laquelle on a ajouté 1 μ M de GTP γ S. La Figure 11(A) présente ces deux profils de fluorescence, immédiatement après l'ajout de GTP γ S dans la condition. La Figure 11(B) présente ces deux mêmes profils après une incubation de 5h à température pièce, menant ainsi au chargement intrinsèque du GTP γ S dans la Rab4 préalablement GDP-liée. On peut observer la diminution d'intensité de fluorescence émise par la forme GTP γ S-liée, tel que décrit dans des travaux antérieurs (Pan et al., 1995).

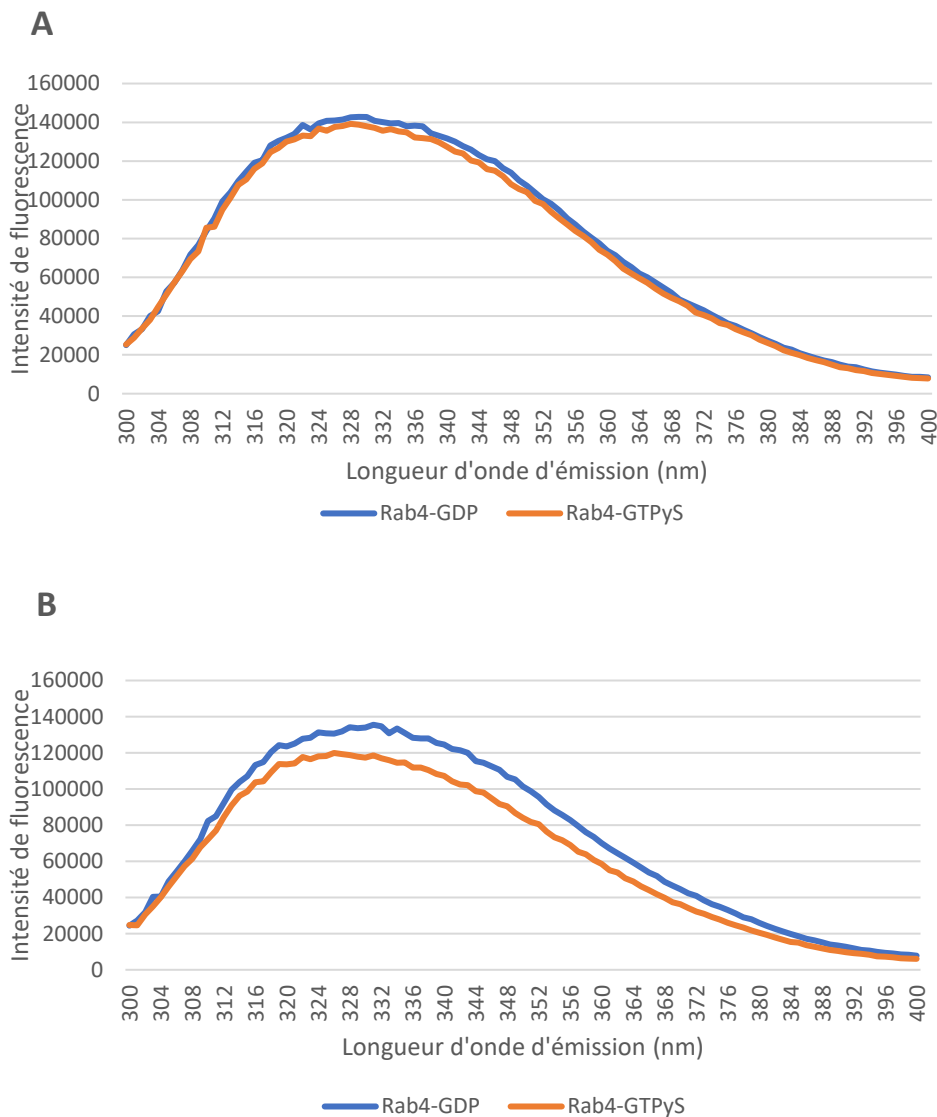


Figure 11 : Fluorescence intrinsèque des tryptophanes de Rab4. Profil de fluorescence de Rab4 (1 μ M) suite à une excitation à 290 nm, en réponse à son chargement en GTP γ S. (A) Profil d'émission au temps 0. (B) Profil d'émission après 5h de chargement intrinsèque à température pièce.

Afin d'en apprendre davantage sur la cinétique de chargement intrinsèque de la GTPase, nous avons jugé pertinent de réaliser des expériences de chargement de Rab4 en temps réel, à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence. Celles-ci permettent l'obtention d'information nécessaire à la caractérisation de la constante de vitesse de chargement (k) en GTP γ S de Rab4. La Figure 12 présente le profil d'émission fluorescente de Rab4 en

réponse à son chargement en GTP γ S. Au temps 0, les protéines Rab4 présentes dans l'échantillon sont toutes chargées en GDP, menant à un signal fort. Au fil du temps, certaines protéines Rab4 présentes dans l'échantillon se chargent en GTP γ S de façon intrinsèque, menant à leur activation. Cette activation mène à un changement conformationnel la protéine, modifiant l'orientation et l'accessibilité des résidus tryptophanes fluorescents qui sont présents dans sa séquence. Cette variation conformationnelle est traduite par une diminution de la fluorescence émise par ces protéines. Tout au long du processus de chargement, la population des protéines Rab4 passe graduellement d'un état GDP-lié à un état GTP γ S-lié. C'est ce changement d'état qui mène à la diminution graduelle de la fluorescence émise, cette diminution étant proportionnelle à l'état de chargement de la population de Rab4 dans l'échantillon.

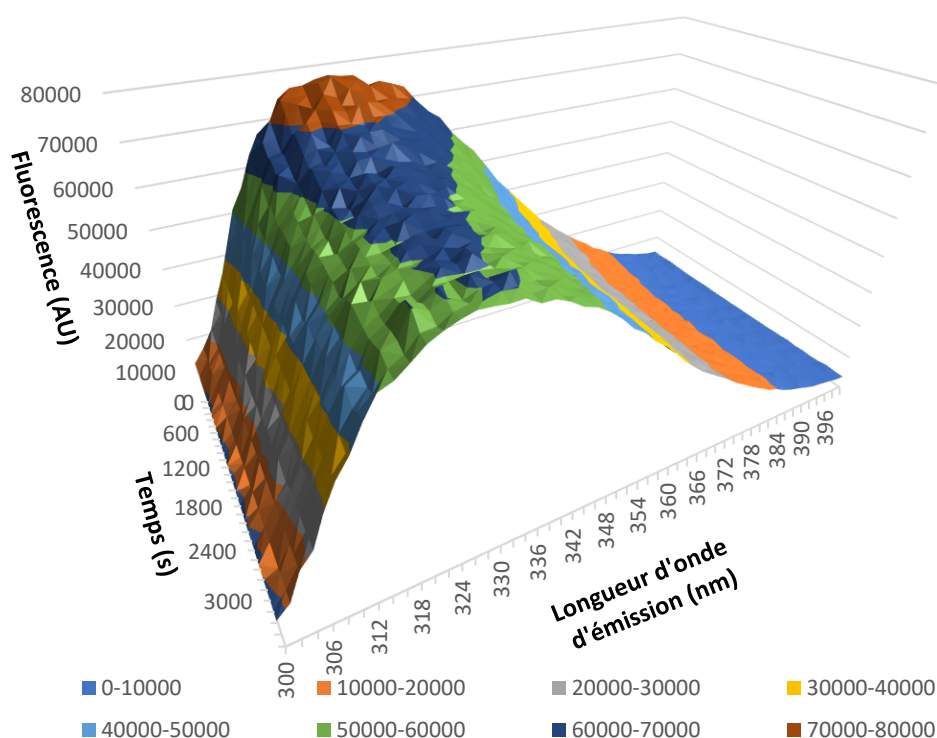


Figure 12 : Chargement intrinsèque de Rab4 en temps réel. Cinétique de fluorescence de Rab4 (1 μ M) suite à une excitation à 290 nm, en réponse à son chargement en GTP γ S.

Afin d'adapter cette méthode à l'obtention des courbes de cinétique de chargement nécessaires à l'extrapolation des constantes de vitesse de la réaction, le protocole a été

simplifié afin de monitorer la fluorescence du pic d'émission maximale à travers le temps. La longueur d'onde de ce pic d'émission maximale est de 340 nm. Cette stratégie permet de simplifier l'obtention et la traite de résultats, tout en étant suffisante pour établir des courbes de chargement. Des contrôles positifs (population 100% Rab4-GTP γ S) et de contrôles négatifs (population 100% Rab4-GDP) ont été mis en place, ceux-ci permettant également de quantifier le quenching des fluorophores. Les cinétiques ont été effectuées en triplicatas, à partir desquels les intervalles d'incertitude (écart types) ont été calculés. Ces données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, permettant l'extrapolation de courbes de décroissance exponentielle dépeignant la cinétique de chargement en GTP γ S de Rab4. Cette méthode nous a permis de quantifier l'effet activateur conféré par la L-PGDS ainsi que celui conféré par le peptide natif court. La Figure 13 est sous-divisée en trois quadrants, chacun représentant une expérience réalisée en triplicata. Les courbes vertes représentent la cinétique du chargement intrinsèque de Rab4. Les courbes oranges représentent la cinétique de chargement de Rab4 facilitée par la L-PGDS. La courbe bleue de la Figure 13(C) représente le chargement de Rab4 facilité par le peptide natif court. Les variations dans l'abrupt des courbes suggèrent un effet sur la cinétique de chargement en GTP γ S de Rab4. Les constantes de vitesse de réaction 'k' ont été extraites des courbes de décroissance exponentielle et affichées dans le Tableau 2, avec l'incertitude qui leur est associée, pour chaque triplicata de la Figure 13.

Les constantes de vitesse 'k' obtenues sont disparates, présentant des variations marquées d'expérience en expérience. Cependant, la constante de vitesse de la réaction de chargement semble être située dans l'ordre du 0.05 min⁻¹. Les variations observées ne nous permettent pas de confirmer l'effet activateur de L-PGDS déterminé dans des études antérieures (Binda et al., 2019). L'effet activateur du peptide natif court n'a également pu être observé, malgré la tendance des constantes 'k' extraites de la Figure 13(C).

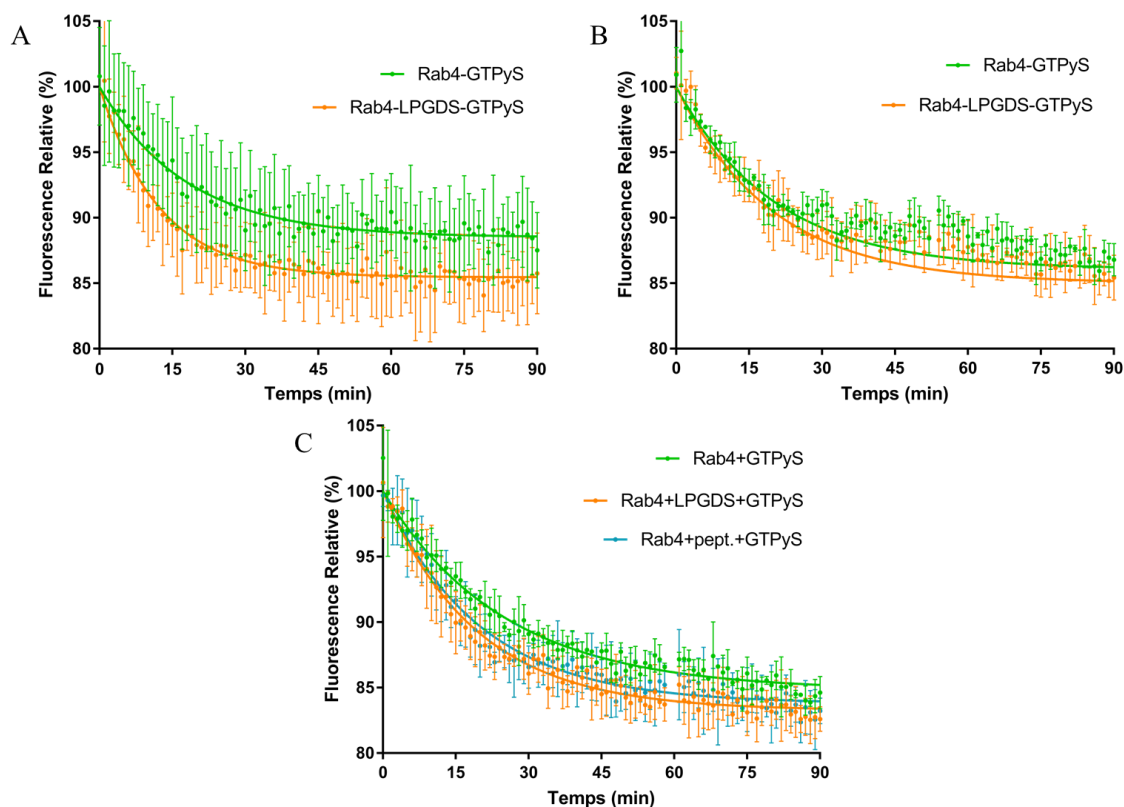


Figure 13 : Cinétique de chargement en GTP γ S de Rab4. Les courbes de décroissance exponentielle sont ajustées aux données obtenues. (A, B, C) Chargement intrinsèque (vert) et chargement facilité par L-PGDS (orange). (C) Chargement facilité par le peptide WT 85-92 (bleu). Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Tableau 2 : Constantes de vitesse de chargement en GTP γ S de Rab4

Condition	Constante de vitesse k (min^{-1})	Différence (min^{-1})
Chargement intrinsèque (vert, A)	0.056 ± 0.006	$\Delta k = 0.026$
Chargement facilité par L-PGDS (orange, A)	0.082 ± 0.006	
Chargement intrinsèque (vert, B)	0.049 ± 0.01	$\Delta k = \emptyset$
Chargement facilité par L-PGDS (orange, B)	0.051 ± 0.01	
Chargement intrinsèque (vert, C)	0.040 ± 0.002	$\Delta k = 0.012, 0.011$
Chargement facilité par L-PGDS (orange, C)	0.052 ± 0.002	
Chargement facilité par peptide WT (bleu, C)	0.051 ± 0.002	

Les résultats obtenus ne pointant pas dans la même direction que les résultats antérieurs quant à l'effet de la L-PGDS et du peptide natif court, nous nous sommes tournés vers une méthode permettant de détecter l'association protéique et d'extraire de l'information par rapport à l'affinité que présente le peptide natif court envers Rab4.

5. Anisotropie de fluorescence, élucidation de l'affinité

Tel qu'énoncé précédemment, la fluorescence des tryptophanes de Rab4 nous permet de sonder le passage d'un état de chargement nucléotidique à l'autre, via le suivi de l'intensité de fluorescence en temps réel. Une autre caractéristique de cette fluorescence permet également de retirer des informations pertinentes quant à l'affinité entre deux molécules.

L'anisotropie de fluorescence est définie par le changement de polarisation de la lumière émise par un fluorophore suite à l'excitation polarisée de celui-ci. Lorsqu'excité avec une lumière polarisée de longueur d'onde adéquate, le fluorophore absorbe ces photons. Cette caractéristique est influencée par la demi-vie d'excitation du fluorophore, définie par le temps requis suite à une excitation pour que 50% des fluorophores excités retournent à leur état basal en émettant un photon. Lorsque le fluorophore absorbe un photon et passe à un niveau d'énergie supérieur, la molécule qui le contient est assujettie à la loi de l'action de masse. Celle-ci va subir une diffusion translationnelle et rotationnelle. Un changement dans la rotation du fluorophore excité mène alors à l'émission subséquente d'un photon dépolarisé par rapport à l'axe d'excitation d'origine. Cette liberté rotationnelle est influencée par plusieurs facteurs, notamment la viscosité du milieu, la température, le volume et la masse du composé contenant le fluorophore. Une baisse de la température, une augmentation de la viscosité du milieu, de la masse ou du volume du composé contenant le fluorophore sont tous des facteurs menant à une diminution de la liberté rotationnelle de celui-ci, résultant ultimement en une hausse de l'anisotropie. La température et la viscosité du milieu étant contrôlées dans nos expériences, le déterminant principal de l'anisotropie est la masse et le volume occupé par composé contenant le fluorophore. Ces propriétés de la matière permettent la mise en place d'essais pouvant monitorer l'augmentation d'anisotropie résultante d'une association entre deux composés (via la formation d'un complexe plus volumineux et plus massif). À l'aide d'un

spectromètre muni de filtres permettant non seulement l'excitation polarisée de l'échantillon, mais également la 'récolte' polarisée du signal lumineux émis (de façon parallèle et perpendiculaire), nous pouvons récolter les données suffisantes à la détermination de l'anisotropie du fluorophore en solution.

Nos fluorophores d'intérêt étant les tryptophanes de Rab4, nous avons voulu quantifier l'affinité du peptide natif court envers la protéine. Une association entre le peptide et la protéine mènerait à une hausse de la masse du complexe contenant le fluorophore, le tout se traduisant par une hausse de l'anisotropie. Nous avons eu recours à la titration du peptide natif court (1-200 μM) envers la Rab4 (1 μM) contenant les fluorophores à l'étude. La Figure 14 présente les valeurs d'anisotropie extraites de cette expérience.

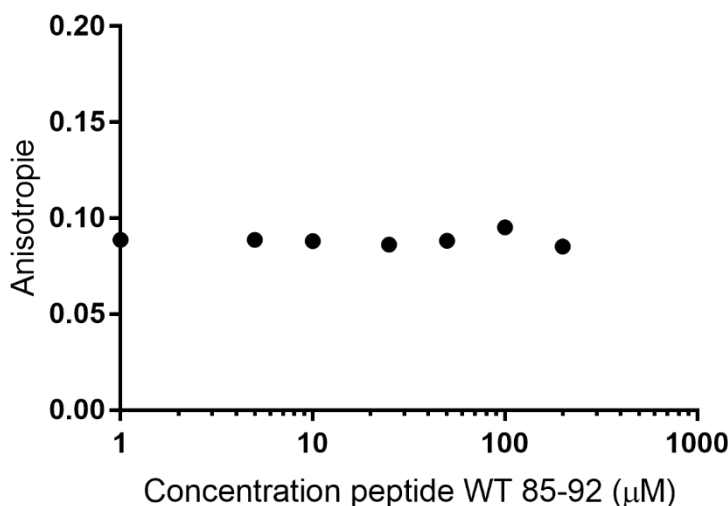


Figure 14 : Anisotropie de fluorescence des tryptophanes de Rab4. Anisotropie des tryptophanes de Rab4 (1 μM) en réponse à la titration du peptide WT dérivé de la séquence de L-PGDS.

Les résultats obtenus ne démontrent pas l'association de Rab4 avec le peptide, mais certaines caractéristiques pourraient expliquer la divergence de ceux-ci. Considérant que le fluorophore à l'étude fait partie de la séquence des 218 acides aminés de Rab4, l'association d'un peptide de 8 acides aminés n'augmenterait la masse du complexe que de 4%. Cette variation est probablement insuffisante pour détecter une hausse notable de l'anisotropie conséquente de l'association des deux molécules.

6. RMN de protéine en solution, site d'interaction de Rab4

En collaboration avec Samuel Génier et le laboratoire du Pr. Pierre Lavigne, nous avons procédé à la caractérisation structurale de Rab4 via la technique de RMN de protéine en solution. Étant donné la variation structurale découlant de l'état de chargement nucléotidique, nous avons caractérisé et assigné les deux états de chargement afin de parfaire notre savoir relatif aux acides aminés impactés par cette oscillation structurale (Génier et al., 2020).

L'élucidation de la structure de protéines par RMN est un procédé assez complexe. La technique exploite les propriétés physiques des atomes avec nombre impair de protons et de neutrons. Ceux-ci ont la caractéristique d'être affectés par un champ magnétique. L'expression et la purification de la Rab4 marquée ^{13}C et ^{15}N en bactérie *E. coli*. est donc nécessaire afin d'élucider sa structure par RMN. Une fois obtenue, la protéine est assujettie à différentes séquences de pulsations d'ondes radios permettant l'obtention d'informations relatives au déplacement chimique de ces atomes ainsi qu'aux transferts de magnétisation qu'ils subissent. Les séquences de pulsations suivantes permettent l'élucidation de la structure de la protéine, suite à une assignation des spectres réalisée par un expert en RMN de protéine : HNCACB, CCC(CO)NH et CBCA(CO)NH (Gordon S. Rule and T. Kevin Hitchens, 2006).

Afin d'en apprendre davantage sur le site d'interaction du peptide natif court sur Rab4, nous avons effectuées des expériences de RMN de Rab4 en solution permettant de comparer les structures de la Rab4-GDP seule ainsi que celle de la Rab4-GDP lorsqu'en présence du peptide. Ayant préalablement identifié la région d'interaction entre Rab4 et L-PGDS (ainsi que les peptides dérivés de sa séquence), nous nous sommes tournés vers la technique de RMN pour mieux élucider la contribution réelle des acides aminés qui génèrent l'affinité observée. La Figure 15(A) présente la superposition des spectres HSQC obtenus pour chaque condition. En noir, on observe le spectre bidimensionnel de Rab4-GDP, tandis qu'en rouge on observe le spectre bidimensionnel de Rab4-GDP en compagnie du peptide natif court. La variation de position entre les pics noirs et rouges est gage d'une perturbation de l'environnement chimique de ces résidus préalablement assignés. Cette

perturbation dans l'environnement chimique est donc résultante de la présence du peptide dans une des deux conditions. Afin de mieux comprendre l'emplacement de ces résidus perturbés par la présence du peptide, nous avons représenté ceux-ci en rouge dans la structure tridimensionnelle de Rab4 obtenue sur PDB (2BME) dans la Figure 15(B).

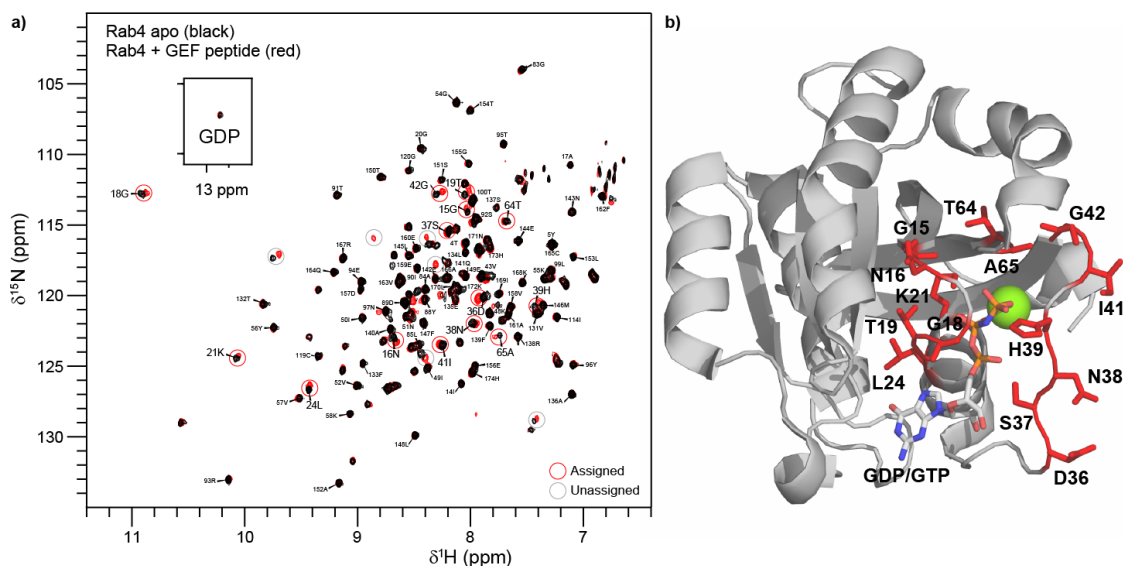


Figure 15 : Superposition des spectres HSQC de Rab4-GDP en présence et en absence du peptide WT 85-92. (A) Superposition des spectres HSQC de Rab4-GDP (200 μ M) et Rab4-GDP en présence du peptide WT. (B) Représentation tridimensionnelle des résidus affectés par l'ajout du peptide WT 85-92 (en rouge).

Tel que théorisé, le peptide natif court semble interagir à proximité de la pochette de liaison nucléotidique. Les acides aminés identifiés en rouge sont pour la plupart des acides aminés faisant partie des régions SwitchI et SwitchII de la GTPase, conséquemment à leur implication dans l'échange nucléotidique de la GTPase.

7. Design du biosenseur FRET de Rab4

Afin de mieux caractériser la localisation cellulaire de la Rab4 activée, mais également de mettre sur pied un outil de criblage de composés à haut débit, nous avons procédé à la création d'un biosenseur FRET permettant de discriminer entre la forme GDP-liée et GTP-liée de la protéine. En effet, ce biosenseur exploite l'affinité différentielle que Rab4

possède pour son effecteur, RABEP1. La stratégie utilisée est inspirée du biosenseur unimoléculaire de la GTPase CDC42 (Hodgson et al., 2010) et est représentée visuellement dans la Figure 16.

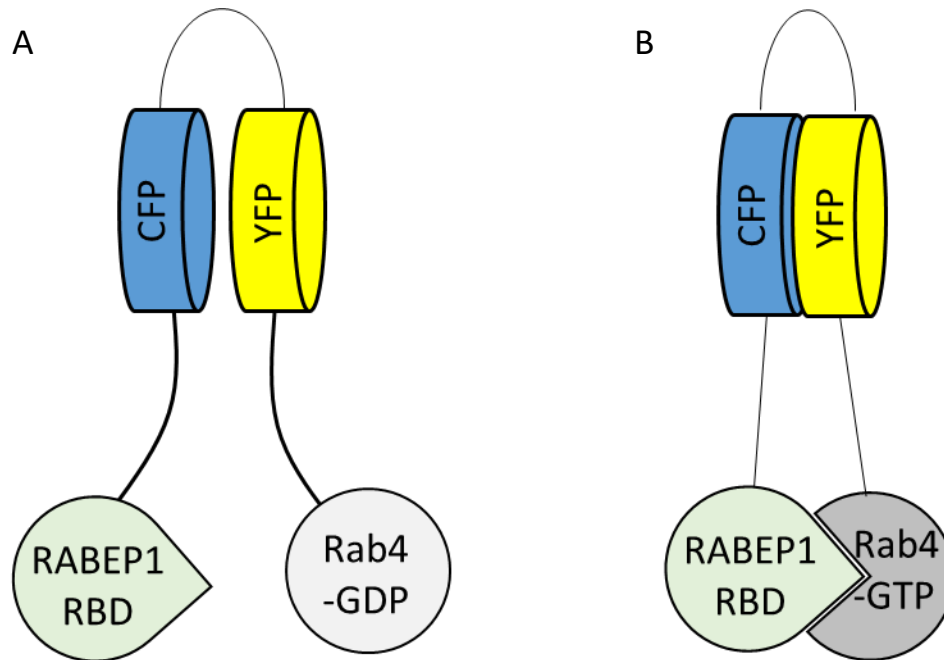


Figure 16 : Représentation théorique simple du fonctionnement du biosenseur unimoléculaire FRET de Rab4. (A) La Rab4-GDP possède moins d'affinité pour sa protéine effectrice. La distance entre les deux protéines fluorescentes permet un signal FRET faible lorsqu'excitation du fluorophore donneur. (B) La Rab4-GTP possède une bonne affinité pour sa protéine effectrice. L'association entre Rab4 et RABEP1 permet le rapprochement des deux protéines fluorescentes, menant ainsi à un signal FRET accentué lorsqu'excitation du fluorophore donneur.

Afin d'en arriver à un biosenseur unimoléculaire fonctionnel, l'étape primordiale est de réduire au maximum la taille de celui-ci. Considérant que le fonctionnement du biosenseur est également limité par son expression (cellulaire ou bactérienne), la création d'une protéine de fusion contenant quatre protéines différentes associées via trois lieux peptidiques représente son lot de complications. Nous avons donc premièrement procédé à la détermination de la séquence minimale de RABEP1 requise pour lier Rab4 et discriminer sa forme GDP ou GTP liée (Figure 17).

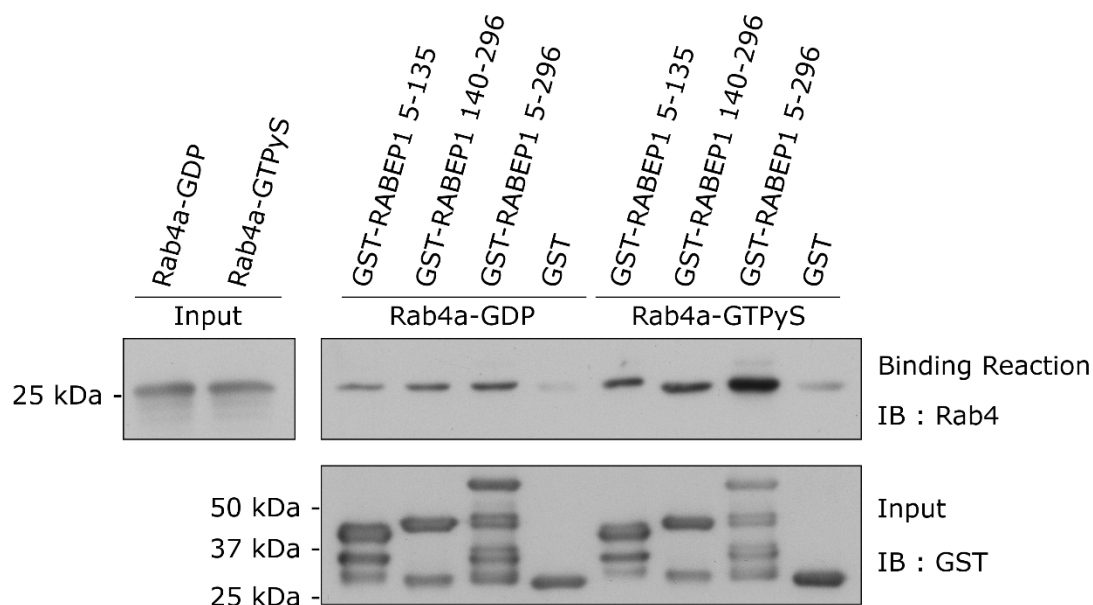


Figure 17 : Éluclation de la séquence minimale du domaine de liaison à Rab4 de RABEP1. Pull-down par affinité des deux états de chargement de Rab4 envers trois séquences de l'effecteur RABEP1 : 5-135, 140-296 et 5-296.

Tel que décrit précédemment, des pulldowns par affinité ont été effectués. Les différentes sous-séquences de RABEP1-GST sont tirées de travaux antérieurs ayant délimité les différents domaines de RABEP1 (Kälin et al., 2015). Dans l'optique de réduire cette séquence prédéterminée au minimum, nous avons généré divers vecteurs pGEX4T1 contenant les séquences codant pour les acides aminés 5-135, 140-296 ainsi que 5-296 de la protéine RABEP1. Leur expression dans ce vecteur permet l'expression et la purification de ces séquences auxquelles est liée l'étiquette GST. La Rab4-GDP a été exprimée à l'aide d'un vecteur pET3a, puis purifiée. La version GDP-liée de Rab4 a été obtenue grâce à l'incubation à température pièce de la protéine fraîchement purifiée. Ceci a pour effet d'hydrolyser le GTP présent dans l'échantillon, menant ainsi à un échantillon 100% GDP-lié. La version GTP γ S-liée fut obtenue suite à l'ajout de GTP γ S et au chargement intrinsèque de l'échantillon de Rab4-GDP, son incubation à température pièce résultant en une population riche en Rab4-GTP γ S. La rangée inférieure de l'immunobuvardage nous indique les niveaux des différentes protéines GST utilisées pour le pulldown. On peut constater que les niveaux sont relativement égaux entre chaque condition. La rangée

supérieure gauche nous indique les niveaux de la protéine Rab4-GDP et Rab4-GTP γ S utilisées dans le pulldown par affinité. Encore une fois, on constate que les niveaux sont très semblables. La rangée supérieure droite contient l'information recherchée, c'est-à-dire l'association de la Rab4-GDP ou -GTP γ S pour les différentes sous-séquences de la RABEP1-GST. Malgré l'affinité différentielle que Rab4 présente pour les trois séquences, la séquence longue (5-296) semble avoir la plus grande association avec Rab4-GTP γ S, malgré son affinité non-nulle pour la forme inactive. Des trois séquences, c'est celle qui présente la plus grande différence d'association entre la forme GDP et GTP liée de Rab4, et c'est donc celle qui a été sélectionnée pour le design ultérieur du biosenseur. La synthèse du biosenseur FRET de Rab4 n'a malheureusement pas pu être complétée, faute de temps et de difficultés de clonages.

Il est à noter que la présence de plusieurs bandes de poids moléculaire inférieur au poids attendu dans les puits où l'on observe les niveaux de protéines-GST est un phénomène courant. Il découle du profil de dégradation de ces constructions. La dégradation observée pourrait être expliquée par différents facteurs, mais la présence des bandes au poids moléculaire attendu nous indique que nos constructions sont présentes dans ces échantillons.

8. Protéomique de Rab4

Notre désir d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de Rab4 nous a mené à l'exploitation de la technique de spectrométrie de masse. En effet, nous avons exprimé la Rab4 WT ainsi que les mutants S22N (dominant négatif) et Q67L (constitutivement actif) dans les cellules HEK 293T, tous trois étiquetés avec la séquence Flag en N-terminal. Les cellules furent ensuite lysées et l'immunoprécipitation des protéines avec étiquette Flag fut réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps reconnaissant cette étiquette. Après plusieurs lavages et suivi d'une digestion à la trypsine de l'échantillon visant à générer de nombreux fragments protéiques cruciaux au fonctionnement de la méthode, les échantillons furent envoyés à la plateforme de spectrométrie de masse. Ces expériences ont été répétées trois fois. Afin de faire un tri parmi les nombreuses protéines retrouvées et d'en extraire uniquement les protéines ayant été enrichies dans les trois conditions, nous

avons rapporté chaque intensité protéique des trois conditions (WT, S22N et Q67L) sur l'intensité de ces protéines dans le contrôle négatif (pcDNA3). Les protéines étant enrichies plus de 1.5 fois par rapport au contrôle ont été conservées. Sur une moyenne de 3200 protéines présentes dans chaque échantillon, seulement 10 à 20 % étaient conservées après l'implémentation de ce seuil minimal. Un tri subséquent basé sur la revue de littérature des protéines a été effectué. Ces cibles ont été triées par intensité, puis vérifiées une à une afin d'identifier des protéines pouvant être reliées à Rab4 (voies de signalisation semblables, élimination des protéines constitutives des voies métaboliques, de synthèse et du noyau). Un autre volet de l'analyse réalisée était de comparer l'intensité et l'enrichissement des cibles préalablement triées par rapport aux IP-MS réalisées avec le mutant constitutivement actif (Rab4-Q67L) et le mutant dominant négatif (Rab4-S22N). Les protéines avec une variation considérable de l'enrichissement entre ces conditions laissent présager une propension d'association à Rab4 différentielle selon l'état d'activation de celle-ci. Par exemple, l'effecteur RABEP1 est plus enrichi dans la condition Q67L, ce qui est logique considérant son affinité différentielle envers la Rab4-GTP. Encore une fois, un tri à la main subséquent a été réalisé, afin d'examiner chaque protéine et d'en comprendre son fonctionnement en recherchant la littérature à leur sujet pouvant indiquer une interaction réelle. Nous fûmes ainsi en mesure d'établir une liste de 18 cibles intéressantes.

Ces protéines identifiées dans le Tableau 3 ci-bas sont des pistes à explorer pour des projets futurs. Leur enrichissement n'est pas gage d'une interaction directe ou indirecte. Des expériences d'immunoprécipitations et de pull-down par affinité seront nécessaires pour confirmer l'interaction entre ces protéines et Rab4. Néanmoins, certaines de ces cibles semblent prometteuses.

Tableau 3 : Extrait des interacteurs potentiels de Rab4. Les protéines affichées ont été triées par enrichissement par rapport au contrôle (FC > 1.5). En vert, les protéines connues pour interagir avec Rab4. En jaune, les protéines dont l'enrichissement était supérieur et dont l'identité est subjectivement intéressante de par leur association potentielle à Rab4. Les valeurs des FC représentent les valeurs obtenues pour chaque n. ∞ indique que la protéine était retrouvée dans l'échantillon d'intérêt mais non dans le contrôle. (-) dénote que la protéine n'était pas détectée dans une expérience donnée.

Gene Name	Protein Name	Fold Changes		
		Rab4-WT	Rab4-S22N (-)	Rab4-Q67L (+)
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	3.5 / 1.6 / 1.7	2.9 / 2.0 / 2.7	1.6 / 1.5 / 2.1
RAB6C	Ras-related protein Rab-6C	∞ / 1199 / ∞	∞ / 1030 / ∞	- / - / ∞
CHM	Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1	∞ / ∞ / ∞	- / ∞ / ∞	∞ / ∞ / ∞
RABEP1	Rab GTPase-binding effector protein 1	9.4 / 8.2 / -	- / 42.9 / 1.6	552.7 / 121.4 / 17.5
RABGAP1	Rab GTPase-activating protein 1	- / 2.9 / -	1.8 / 2.5 / 3.0	2.5 / 5.6 / 2.5
CHML	Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 2	∞ / 52.1 / 45.3	∞ / 7.0 / 8.9	- / 24.1 / 21.6
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	∞ / - / 12.2	∞ / 14.7 / 34.7	- / 8.7 / 11.6
TIAM1	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	∞ / 18.5 / 10.6	∞ / 18.0 / 14.0	∞ / 19.2 / 16.0
CARM1	Histone-arginine methyltransferase CARM1	∞ / - / 10.0	∞ / 11.2 / 27.1	∞ / 16.7 / 17.8
PARD3	Partitioning defective 3 homolog	495 / ∞ / -	489 / ∞ / 1490	4.2 / ∞ / 571
PARVB	Beta-parvin	- / - / -	∞ / 3.8 / 2.7	- / - / -
PHB	Prohibitin	5.1 / 7.8 / -	6.1 / 3.9 / 12.0	4.7 / 7.3 / 2.5
SCAMP2	Secretory carrier-associated membrane protein 2	- / 3.6 / -	3.7 / 4.1 / -	- / 3.8 / 1.5
SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3	- / 2.9 / 4.1	3.2 / 3.5 / 11.0	3.1 / 3.0 / -
SASH1	SAM and SH3 domain- containing protein 1	∞ / - / 2785	∞ / ∞ / 6512	- / - / -
VPS13C	Vacuolar protein sorting- associated protein 13C	3.1 / 12.4 / 3.5	3.4 / 14.8 / 9.6	3.3 / 10.1 / 6.3
FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain- containing protein 1	- / - / ∞	- / ∞ / ∞	- / - / ∞
MRPL11	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	98.8 / 125.2 / 115	- / 87.5 / 174.4	- / - / 2.9

DISCUSSION

Les études réalisées lors de mon projet de maîtrise ont permis le design rationnel et la synthèse d'une gamme de composés peptidiques synthétiques pouvant lier et influencer la petite GTPase Rab4 dans ses fonctions. Les résultats présentés ci-haut nous ont permis d'en apprendre davantage en ce qui a trait aux déterminants de l'association L-PGDS/Rab4 préalablement identifiée (Binda et al., 2019). En vue de caractériser l'effet de ces peptides, différentes méthodes de récolte d'information nécessaires à la caractérisation de leur effet sur Rab4 ont été développées. De plus, des expériences de protéomique de Rab4 ont également mené à l'identification de partenaires protéiques potentiels, lesquels pourront être caractérisés davantage dans des expériences postérieures à cet ouvrage. Des efforts ont également été fournis dans la confection d'un biosenseur FRET de Rab4, lequel permettrait d'approfondir les connaissances quant à la localisation cellulaire de la Rab4 active. Une fois sa confection achevée, cet outil puissant pourrait améliorer notre procédé de criblage de composés influençant Rab4 dans son activité GTPasique.

1. Criblage des peptides

Les peptides présentés dans le Tableau 1 ont été synthétisés en vue de tester leurs effets sur Rab4. Les méthodes utilisées à l'aube de ce projet multidisciplinaire étaient basées sur l'affinité différentielle que Rab4 présente pour son effecteur RABEP1. Bien que ces méthodes aient permis d'évaluer semi-quantitativement l'effet des composés sur le chargement en GTP de Rab4, nous voulûmes tourner notre attention vers la mise en place de méthodes plus rapides et directes pour arriver à ces fins. Compte tenu de la grande interdisciplinarité du projet et des avenues qui en découleraient relativement à son succès, la mise sur pied de méthodes permettant un criblage efficace s'avérait être cruciale, d'autant plus que les peptides présentés ci-haut ne sont qu'une première génération de composés. À la suite de l'élucidation structurale du site d'interaction peptide/Rab4 et de la mise sur pied d'un essai permettant l'analyse robuste de leur effet sur l'échange nucléotidique de la protéine, assez d'information quant aux pharmacophores nécessaires à leur fonctionnement permettrait la synthèse de plusieurs autres peptides et peptidomimétiques, dans l'optique de raffiner leurs propriétés physicochimiques. Bien que la présente étude n'ait pas pu en arriver à la génération de composés de deuxième

génération, la mise sur place de méthodes robustes pour l'évaluation de leurs propriétés y est abordée afin de permettre l'avancement du projet, dont l'ampleur est plus grande et diversifiée que la visée de mon projet de maîtrise.

2. Méthodes utilisées, validité

Les méthodes utilisées dans cet ouvrage possèdent toutes des forces et des faiblesses qui justifient leur utilisation, lesquelles sont abordées dans cette partie.

2.1. Synthèse peptidique sur phase solide

Afin d'obtenir les composés décrits dans le Tableau 1, ceux-ci ont été synthétisés sur phase solide. La synthèse de peptides sur phase solide est la méthode la plus utilisée pour fin de synthèse de composés avec un backbone peptidique. En plus d'être relativement simple, il s'agit de la technique la plus efficace pour synthétiser des peptides purs avec un assez bon rendement.

2.2. GTP γ S-loadings

Les essais de GTP γ S-loading ont mené à l'identification de l'effet activateur que L-PGDS possède envers Rab4 (Binda et al., 2019). Ceux-ci sont adaptés de protocoles qui figurent dans certaines études dont l'objectif est la caractérisation de nouvelles protéines activatrices des GTPases (Jean et al., 2012). Cette technique permet d'évaluer l'activation des GTPases de façon semi-quantitative, via l'intensité du signal émis suite à la révélation des immunobuvardages. L'établissement de ratios d'intensité permet alors de comparer les niveaux de GTPase activée entre chaque condition, lesquels sont influencés par l'ajout d'une protéine activatrice dans l'échantillon. Le fonctionnement de la technique repose sur l'interaction entre la GTPase et sa protéine effectrice spécifique, l'affinité de cette interaction étant diminuée ou accrue selon l'état de chargement nucléotidique de la GTPase. Bien qu'elle permette l'identification sommaire des conditions qui résultent en une accélération du rythme de chargement de la GTPase à l'étude, cette technique n'est pas applicable au suivi d'une cinétique de chargement. Vu le besoin de mettre fin aux réactions de chargement manuellement pour chaque temps préétabli via l'ajout du cofacteur magnésium divalent en excès, cette technique repose fortement sur l'assiduité du

manipulateur devant démarrer et arrêter chacun des temps avec précision. En plus d'être influencée par les écarts de températures résultants de la manipulation fréquente des tubes mis sur glace, la multiplicité des étapes subséquentes mènent ultimement à une incertitude dans les résultats obtenus. L'exploitation de la différence d'affinité que la GTPase possède envers son effecteur fait également de cette méthode une technique indirecte d'évaluation des niveaux de chargement de la GTPase. Par opposition aux méthodes directes permettant de mesurer soit la concentration en GDP ou en GTP dans l'échantillon ou bien d'évaluer un changement conformationnel en direct, les méthodes indirectes reposant sur l'affinité envers une autre protéine possèdent davantage de variables pouvant altérer les résultats obtenus. L'affinité que les GTPases possèdent envers leurs protéines effectrices est dépendante de l'état de chargement en GDP ou en GTP, mais cette variation ne résulte pas nécessairement en une perte totale d'affinité, facteur de non-binarité pouvant également affecter les résultats obtenus. À la lumière de ces limitations, l'évaluation quantitative d'une cinétique de chargement à l'aide de cette technique est alors impensable. Ces limitations nous ont poussé à se tourner vers des méthodes directes d'évaluation de la cinétique de chargement de Rab4.

2.3. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes

Cette méthode, tel qu'expliquée précédemment, exploite la modulation d'intensité de fluorescence des tryptophanes résultant d'un changement conformationnel de la protéine. En effet, lorsque GDP-liée, la fluorescence émise par les tryptophanes de Rab4 est accrue. Cette propriété nous permet alors d'établir les deux limites d'intensité de fluorescence de Rab4. La limite supérieure de fluorescence est définie par un échantillon de Rab4-GDP, menant au signal maximal de fluorescence. La limite inférieure de fluorescence est définie par un échantillon de Rab4 chargé en GTP γ S, menant au signal minimal de fluorescence. Ce qu'on monitore est donc l'intensité de la fluorescence émise par une population de Rab4 100% GDP-liée à laquelle on ajoute du GTP γ S au début de l'expérience. Comme l'affinité pour Rab4 du GTP γ S est supérieure à celle du GDP, ces derniers sont peu à peu expulsés du site actif, sous la loi de l'action de masse, et remplacés par leurs homologues plus affins, jusqu'à l'obtention d'une population à l'équilibre quasi-totalement chargée en GTP γ S. Le monitoring de cette diminution de fluorescence, encadré par les limites inférieures et

supérieures de fluorescence atteignable, permet donc le suivi du chargement en GTP γ S d'une population de Rab4 préalablement chargée en GDP. Ce sont les fondements qui régissent l'interprétation des données obtenues.

Bien que théoriquement établie, cette méthode comporte certaines limitations. L'une d'elles est de nature fondamentale, relative au quenching des fluorophores à la suite d'une excitation continue. L'autre est de nature expérimentale, relative aux technicalités dans les manipulations qui sont nécessaires à l'obtention de résultats. Pour ce qui est du quenching, nous nous sommes premièrement posé la question suivante : le quenching est-il aussi important pour Rab4-GDP que pour Rab4-GTP γ S? Afin d'y répondre, nous avons donc mis sur place deux contrôles de même concentration protéique, préalablement chargés en GTP γ S ou en GDP. Ces deux contrôles ont été sujets à une excitation identique pour la même durée. Afin d'évaluer l'ampleur du quenching, nous avons établi des ratios d'intensité maximale d'émission pré- et post-excitation. Ces ratios nous ont permis de confirmer que le quenching est relativement identique pour les deux formes de la GTPase. Côté expérimental, une des causes d'erreurs la plus importante est relative à l'ajout du GTP γ S dans chaque condition afin de débiter la cinétique. Effectué en triplicata dans un volume de 100 μ L sur des plaques 96-puits, la cinétique est entamée directement après l'ajout de l'analogue du GTP dans la condition. Il existe cependant un délai non-négligeable entre l'ajout du réactif et le début de la lecture par l'appareil. D'autant plus, ce délai mène à une mauvaise évaluation de la courbe extraite des données obtenues, étant donné que les premières lectures ne sont pas représentatives du temps de départ réel de la réaction de chargement. Nous avons essayé de contrevenir à ce facteur via l'utilisation de pipettes multi-channel, lesquelles permettent un ajout beaucoup plus efficace du réactif de départ. Toutefois, considérant que la cinétique à l'étude se traduit par une courbe de décroissance exponentielle, la pente de la réaction est à son plus abrupt au début de celle-ci. Ces secondes cruciales non-monitorées influencent donc les données extraites de ces expériences.

En somme, l'exploitation de la fluorescence intrinsèque des tryptophanes pour évaluer la cinétique de chargement est une méthode avantageuse. Cette technique nécessite peu de réactifs, permet l'extraction de constantes de vitesse de la réaction de chargement, et permet également le criblage de composés pouvant altérer cette vitesse de chargement.

2.4. Anisotropie

La technique d'anisotropie permet de monitorer l'association entre une molécule fluorescente et une autre via les changements de polarité de la fluorescence émise, tel qu'expliqué plus tôt. Les expériences que nous avons réalisées n'ont pas permis d'obtenir de l'information supplémentaire quant à l'affinité que présente Rab4 envers le peptide natif de séquence courte. Tel qu'énoncé dans les résultats, ceci découle probablement du fait que le complexe formé ne menait pas à une augmentation suffisante et détectable de la masse de celui-ci. Avec le recul, nous aurions dû procéder à l'expérience inverse, c'est-à-dire de monitorer l'association d'un peptide fluorescent à la protéine Rab4. L'association du peptide avec Rab4 aurait donc mené à une augmentation d'environ 30 fois la masse du peptide seul, laquelle aurait été détectable via cette technique. Pour ce faire, nous aurions dû procéder au design et à la synthèse d'un analogue du peptide natif court (85-92) auquel on aurait ajouté un fluorophore. Ceci aurait permis l'expérience inverse et l'obtention de données permettant l'élucidation de l'affinité que possède le peptide envers Rab4. Malheureusement, n'ayant pas ce peptide sous la main et n'ayant plus le temps de procéder à sa synthèse et à sa purification, cette expérience n'a pu être réalisée dans le cadre de ma maîtrise.

2.5. RMN

Les expériences de RMN réalisées sont les plus robustes. Elles ont permis l'élucidation structurale de Rab4 sous ses deux états de chargement, ainsi que la caractérisation de la cinétique de chargement et d'hydrolyse intrinsèque de la protéine (Génier et al., 2020). De plus, la comparaison des spectres RMN bidimensionnels obtenus nous a permis d'identifier les résidus de Rab4 prenant part à l'interaction avec le peptide natif court (85-92). Les résidus spécifiques identifiés seront abordés dans la partie suivante. En somme, la technique de RMN est vraiment puissante, bien qu'elle requière une quantité relativement grande de la protéine à l'étude, laquelle doit être exprimée et purifiée de façon double ou simple marquée (C^{13}/N^{15} ou N^{15}). Cependant, la réalisation d'expériences est longue et l'analyse des résultats doit être effectuée par un professionnel formé dans l'interprétation et l'assignation de ces spectres. Somme toute, la RMN est un excellent outil de

caractérisation de l'interaction Rab4/peptides, quoique la technique est couteuse et lente, ce qui n'en fait pas une technique de référence pour le criblage de la librairie de peptides préalablement synthétisés, faute de temps et de ressources nécessaires. La RMN de Rab4 serait cependant une excellente façon de confirmer et de caractériser davantage l'interaction entre Rab4 et les peptides prometteurs préalablement observés par une autre technique plus rapide et moins couteuse.

2.6. Biosenseur FRET de Rab4

La création d'un biosenseur protéique unimoléculaire FRET de Rab4 est un procédé assez complexe, considérant les multiples étapes et cycles de perfectionnement nécessaires à l'obtention d'un biosenseur fonctionnel. Puisque nous nous sommes inspirés des biosenseurs FRET de GTPases développés par l'équipe du Dr Hodgson (Hodgson et al., 2010), nous avons obtenu les constructions (plasmides) utilisées dans leurs essais. Nous avons procédé à des sous-clonages afin d'extraire les sections spécifiques à la GTPase pour laquelle le biosenseur fut originellement créé. Les clonages subséquents ont été difficiles à réaliser pour des raisons encore nébuleuses. Nous avons essayé plusieurs méthodes afin d'arriver à l'insertion de la séquence de Rab4 et de RABEP1 dans le plasmide pTriex préalablement obtenu. Ces clonages se sont avérés infructueux, le tout nous menant à envisager une différente stratégie de clonage, via l'utilisation d'un vecteur fréquemment utilisé dans le laboratoire, le plasmide d'expression cellulaire pcDNA3. Suite au design d'amorces permettant l'amplification des séquences de Rab4 et de RABEP1 ainsi que l'ajout des séquences reconnues par les enzymes de restriction pertinentes au clonage à effectuer, nous avons effectué ces clonages, encore une fois sans succès. L'étape à laquelle nous étions rendus consiste en le sous-clonage de ces fragments de séquence du biosenseur dans un vecteur pBluscript, permettant de visualiser les colonies bactériennes ayant incorporé le vecteur circulaire résultant du clonage fructueux. Faute de temps, ces efforts seront maintenus par la relève à laquelle ce projet sera attribué.

3. Élucidation structurelle

Les expériences de chargement en GTP γ S et les expériences de RMN de protéine en solution nous ont permis d'en apprendre davantage quant aux acides aminés impliqués dans

l'interaction entre Rab4 et les peptides dérivés de la séquence de L-PGDS. Étant donné l'effet accélérant des peptides sur le rythme d'échange nucléotidique de Rab4, nous avons émis l'hypothèse que la zone d'interaction sur Rab4 était formée par les acides aminés à proximité du site actif de la protéine. Les expériences de RMN de Rab4 avec ajout du peptide WT nous permettent de confirmer cette hypothèse. En effet, le peptide engendre une variation dans l'environnement chimique de plusieurs acides aminés présents dans les régions Switch I, Switch II et P-loop. De plus, la plupart des acides aminés identifiés par cette approche sont connus comme étant impliqués dans la liaison de Rab4 au groupement phosphate du GTP. Nous pouvons donc déduire que le peptide semble avoir un effet localisé auprès du site actif. Nous théorisons que le peptide facilite le délogement du GDP de ce site et favorise ainsi l'entrée d'un autre nucléotide avoisinant, de façon similaire à l'action des GEFs. L'information acquise dans les essais de GTP γ S-loading quant à l'effet des peptides alanine scan sur le chargement en GTP de Rab4 nous a également permis d'identifier certains acides aminés du peptide dont la substitution semble avoir un rôle délétère sur l'effet qui est conféré par le peptide WT complet. Le remplacement des acides aminés Q88, C89 et E90 mène à la formation de composés qui peuvent interagir avec Rab4 sans toutefois activer autant la GTPase que le peptide WT.

Des efforts ont également été fournis afin de caractériser l'effet de l'association de Rab4 à la protéine L-PGDS complète. Malheureusement, des embûches relatives à l'expression suffisante de L-PGDS en bactérie *E. coli* sont survenues, prévenant l'élucidation de son site d'interaction avec Rab4 via RMN. Cependant, ces piètres rendements de purification à la suite de l'expression bactérienne de la protéine pourraient être atténués via l'utilisation d'un autre système d'expression protéique. Des travaux postérieurs à cet ouvrage qui pourraient donc aborder la caractérisation structurelle de la protéine L-PGDS, dont l'interaction avec Rab4 ainsi que son effet potentialisateur de l'échange nucléotidique, sont centraux à mon projet. Ceci pourrait être un outil puissant menant au design de composés pouvant mieux mimer la disposition tridimensionnelle de la séquence de la protéine L-PGDS en complexe avec Rab4.

4. Peptides TAT et modèle in cellulo

Tel que présenté dans le Tableau 1, nous avons également procédé à la synthèse de peptides auxquels la séquence d'une protéine virale issue du VIH a été ajoutée. Celle-ci mène à la pénétration membranaire des composés, via un mécanisme n'ayant pas encore été totalement élucidé. Le but derrière cette approche est de permettre l'utilisation des composés-TAT en cellule, par opposition aux composés natifs étant incapables de pénétrer la bicouche lipidique cellulaire (Benet et al., 2016). Cela facilite donc la caractérisation des effets cellulaires qui sont engendrés par l'administration de nos composés, quoiqu'en comportant, certes, quelques limitations. La séquence TAT utilisée (RKKRRQRRR) est riche en arginine et comporte neuf acides aminés polaires ou chargés dans sa séquence. Quoique permettant l'entrée du composé-TAT dans le modèle à l'étude en vue d'évaluer son effet sur diverses caractéristiques cellulaires, l'ajout de cette séquence pénétrante soulève quelques interrogations.

L'une d'elles est relative à l'effet qu'engendre l'ajout d'une séquence pénétrante plus massive et hautement polaire, en C-terminal de nos composés peptidiques. En effet, la compréhension incomplète du mécanisme d'entrée cellulaire de la séquence TAT ne nous permet pas de supposer que cette séquence est clivée à la suite de son entrée en cellule. Si tel n'est pas le cas, les propriétés physicochimiques du dit peptide et l'affinité qu'il présente envers Rab4 sont inévitablement affectées par l'ajout de cette séquence hautement positivement chargée, le tout se traduisant probablement par une baisse d'affinité du peptide-TAT envers Rab4, par opposition à son homologue non-pénétrant.

Une autre interrogation a trait à l'acheminement cellulaire du peptide à la suite de sa pénétration à la membrane plasmique. Certaines études (Gräslund et al., 2011; Richard et al., 2003) ont mené à l'identification de divers mécanismes de pénétration cellulaire de la séquence TAT, lesquels sont fortement dépendants de la concentration du composé-TAT dans le milieu. La plupart des mécanismes d'entrée étudiés suggèrent une association de la séquence TAT aux membranes ainsi qu'un trafic vésiculaire subséquent, lequel est relatif à son mécanisme d'entrée. La concentration effective du composé-TAT qui est réellement acheminée aux membranes Rab4-positives n'est donc qu'une fraction de la dose

administrée dans le milieu cellulaire. De plus, l'association membranaire des composés-TAT et leur faible concentration cytosolique soulève des limitations relatives à la probabilité d'association des composés-TAT à leur cible Rab4. En effet, les composés-TAT qui sont associés aux membranes sont restreints à ce plan « bidimensionnel » et présentent une liberté rotationnelle et translationnelle amoindrie, ces contraintes affectant ainsi leur orientation dans l'espace et la probabilité d'association à leur cible Rab4, laquelle est également associée aux membranes.

Ces peptides (Tableau 1) ont donc été synthétisés et sont prêts à tester dans un modèle approprié. Il était prévu de réaliser des essais de prolifération et de viabilité cellulaire dans une lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif, les cellules MDA-MB-231. Faute de temps, cet aspect du projet a été mis à l'écart.

5. Conséquences cellulaires attendues d'une inhibition de Rab4

Tel qu'abordé dans l'introduction, cibler Rab4 pourrait s'avérer être une avenue intéressante dans le traitement de certaines pathologies qui dépendent de sa surexpression et/ou des mutations somatiques qui influencent son activité. Bien qu'étant exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des types cellulaires, il a été démontré (Frittoli et al., 2014) que certains types de cancers, notamment le cancer du sein triple-négatif, surexpriment Rab4 et exploitent à tort son rôle dans le recyclage à la membrane plasmique. En synergie avec Rab5, la surexpression de Rab4 favorise le recyclage continu de certaines protéines. Ce recyclage incessant a pour effet de mener à la création de sous-structures membranaires composées de protéines qui facilitent la dégradation des matrices extracellulaires. Ces structures, appelées invadosomes, sont recyclées puis réacheminées à la membrane dans un cycle accéléré par la surexpression des protéines Rab4 et Rab5. Ce processus mène ultimement à la dégradation graduelle des matrices extracellulaires. La surexpression de Rab4 confère ainsi un avantage évolutif aux cellules cancéreuses aux abords de la tumeur, en accroissant leur potentiel métastatique.

Nous sommes conscients qu'une inhibition globale de Rab4 pourrait s'avérer délétère pour l'organisme, considérant son implication dans le recyclage à la membrane de la plupart des

types cellulaires. Néanmoins, n'étant point des inhibiteurs du site actif, nos composés semblent agir au niveau de l'association de Rab4 avec sa protéine activatrice L-PGDS. Nos composés Q88A, C89A et E90A semblent également s'associer à ce site sans toutefois promouvoir l'échange nucléotidique. Cette stratégie d'inhibition de Rab4, basée sur la compétition de nos composés avec la protéine activatrice de Rab4, est une méthode plus « douce » qu'une inhibition directe du site actif de la GTPase, puisqu'elle module indirectement son état de chargement nucléotidique. De plus, cette approche permet d'éviter les problèmes de spécificité que présentent les inhibiteurs du site actif des GTPases, considérant la grande similitude du site actif des membres d'une même sous-famille. Cette caractéristique est très limitante dans le développement d'inhibiteurs du site actif des GTPases (Cox et al., 2014).

Nous croyons qu'une inhibition de l'activation médiée par L-PGDS de Rab4 permettrait de réduire sa fréquence d'activation à la membrane, entravant ainsi la vitesse du cycle de recyclage vers l'endosome précoce pour lequel Rab4 et Rab5 sont les principaux régulateurs. Suivant cette logique, cette réduction permettrait ainsi de diminuer la formation d'invadosomes à la membrane, et de réduire le potentiel métastatique de certains cancers.

Il est cependant important de souligner que certains candidats pourraient engendrer une facilitation de l'échange nucléotidique de Rab4, de façon comparable à l'effet canonique d'une interaction Rab4/L-PGDS. En effet, certains peptides ayant été synthétisés présentaient de telles propriétés (Figure 10). Il est cohérent que les peptides dérivés de la séquence d'interaction L-PGDS/Rab4 présentent des propriétés semblables à la protéine L-PGDS complète. Cela dit, on souligne ici l'importance du travail d'optimisation des propriétés pharmacologiques de ces peptides. L'objectif est de modifier leur structure afin d'en faire des candidats qui conservent l'affinité que L-PGDS détient envers Rab4 tout en minimisant l'activation de cette dernière. De tels candidats ont été identifiés (Figure 10) et feront office de gabarit pour la synthèse d'une gamme de composés de deuxième génération.

Évidemment, les composés que nous avons synthétisés présentent de piètres propriétés pharmacologiques, vu leur composition peptidique. Il faut garder en tête que nous prévoyons procéder à la synthèse de dérivés peptidomimétiques et macrocycliques avec de meilleures propriétés pharmacologiques, lesquels seront obtenus par design rationnel dérivé de l'information structurale obtenue lors de la première ronde de criblage de nos composés.

6. Mécanismes d'action possibles

Nous posons l'hypothèse que la facilitation de l'échange nucléotidique de Rab4 conférée par L-PGDS est un processus réalisé en plusieurs étapes, de façon semblable aux mécanismes élucidés chez plusieurs autres GTPases humaines (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013).

Nous croyons que l'une de ces étapes est la déstabilisation du motif Switch I de Rab4 via une interaction avec L-PGDS. En effet, le motif Switch I est assez rigide et fixé à la protéine lorsqu'il est actif (GTP-lié), mais suite à l'hydrolyse du GTP dans la pochette catalytique, le motif Switch I devient plus flexible (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013). Nous croyons que la séquence 85-92 de L-PGDS vient s'insérer entre ce motif et la pochette catalytique (P-loop et GDP) afin d'amoindrir l'affinité du GDP envers la protéine. Les expériences de RMN de Rab4 réalisées à la Figure 15 appuient cette théorie, considérant que les acides aminés de Rab4 les plus affectés par la liaison du peptide WT sont ceux qui composent le motif Switch I et le P-loop.

Nous croyons également que certains des acides aminés ainsi insérés entre le motif Switch I et le GDP pourraient participer à l'expulsion du GDP de la pochette catalytique par la formation de liens avec la P-loop de Rab4, l'ion Mg^{2+} , ou même le GDP, diminuant davantage l'affinité du GDP envers la pochette catalytique.

Ce mécanisme hypothétique pourrait expliquer le comportement que certains mutants de L-PGDS et leurs peptides présentent à l'égard de Rab4. En effet, tel que présenté dans la Figure 10, certains peptides « manchots » synthétisés compétitionnent avec la L-PGDS

complète pour lier Rab4 sans toutefois activer celle-ci. Ceci nous indique qu'ils possèdent une affinité envers Rab4 mais ne mènent pas à une expulsion du GDP de la pochette catalytique aussi marquée que la protéine complète ou le peptide WT. Ces peptides mutants de la séquence 85-92 de L-PGDS sont les suivants : E90A, Q88A, C89A.

De ces trois acides aminés, la substitution de l'acide aminé E90 pour une alanine semble être celle qui affecte le plus le potentiel de facilitation de l'échange nucléotidique du peptide. Nous croyons donc que cet acide aminé est impliqué dans la formation de liens avec Rab4, le GDP, ou l'ion Mg^{2+} , lesquels résultent en une expulsion du GDP et en la dissolution du complexe LPGDS-nucléotide-Rab4. La nature de ces liens est encore nébuleuse et devra faire l'office d'une élucidation structurale et mécanistique plus approfondie. Afin d'aider à la visualisation de cette interaction, la Figure 18 représente l'orientation et la disposition présumée du peptide WT lorsqu'amarré à Rab4.

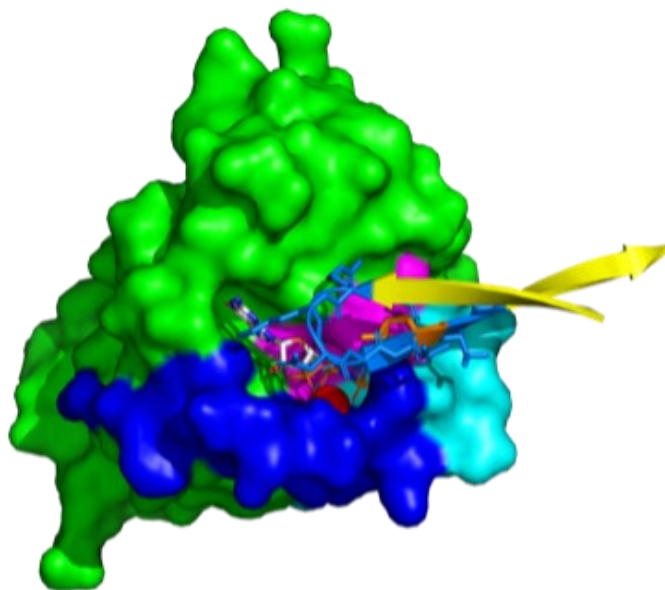


Figure 18 : Représentation de l'orientation présumée du peptide WT (ruban) sur Rab4 (surface). Les domaines Switch I, SwitchII et P-loop représentés en bleu, cyan et magenta, respectivement. L'ion magnésium divalent est représenté en rouge et l'analogue non-hydrolysable du GTP, le GppNHp, est présent dans le site actif. Le peptide WT est représenté en jaune et en bleu (séquence 85-92). L'acide aminé orange est le E90.

7. Partenaires potentiels identifiés en protéomique

Les expériences de spectrométrie de masse que nous avons réalisées nous ont permis d'identifier une liste de nouveaux interacteurs potentiels de Rab4. Ceux-ci ont été triés en vue de leur enrichissement protéique par rapport au contrôle, puis triés à la main en vue de l'identification de protéines pour lesquelles la littérature existante permet de supposer un lien fonctionnel avec Rab4.

Les protéines identifiées en vert dans le Tableau 3 représentent les interacteurs connus de Rab4; des protéines dont l'association directe ou indirecte à la GTPase a été démontrée. On y retrouve les deux sous-unités de la géranylgéranyl transférase de Rab4, les GTPases Rab5 et Rab6, la GAP de Rab6 RABGAP1 ainsi que la protéine effectrice de Rab4, RABEP1.

Les protéines identifiées en jaune sont des interacteurs potentiels de Rab4. Les raisons justifiant leur tri seront étalées, pour chacune des cibles, ci-dessous. GNAI1 est la sous-unité alpha de la protéine hétérotrimérique Gi, dont le couplage aux GPCR permet la transduction du signal lorsqu'activation de ce dernier. Nous avons considéré cette cible car la littérature au sujet du cross-talk entre les petites GTPases et protéines G hétérotrimériques recense des exemples d'interaction, directe ou indirecte, entre ces deux dernières. Les sous-unités alpha des protéines hétérotrimériques G₁₂ et G₁₃ interagissent et sont activées par RhoGEF, une GEF de la petite GTPase Rho (Suzuki et al., 2009). La sous unité alpha de la protéine hétérotrimérique G_o interagit directement avec les petites GTPases Rab4 et Rab5 (Purvanov et al., 2010). De plus, les Rab impliquées dans le transport vésiculaire régulent le transport de divers récepteurs couplés aux protéines G. Il a été démontré que le récepteur β 2-adrénergique interagit directement avec la petite GTPase Rab8 (Dong et al., 2010) et que le récepteur TP β interagit directement avec Rab11 (Hamelin et al., 2005). Nous envisageons donc la possibilité d'un couplage fonctionnel, direct ou indirect, entre Rab4 et G α i. La confirmation de cette interaction par d'autres méthodes est nécessaire, et les mécanismes qui sont sous-jacents à celle-ci devront être investigués.

TIAM1 est une protéine possédant plusieurs domaines, dont un domaine activateur (GEF) des petites GTPases de la sous-famille des Rho. Elle active principalement Rac1, impliquée dans la migration cellulaire et l'adhésion matrice-cellule. Il a été démontré que la dérégulation de TIAM1 est impliquée dans le développement de certains cancers invasifs, notamment les cancers colorectaux (Minard et al., 2006). Étant localisée principalement à la membrane plasmique et étant impliqué dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, nous pensons que TIAM1 pourrait subir un recyclage Rab4/Rab5-dépendant, et pourrait également influencer l'activité de la GTPase. Il est aussi concevable que Rab4 module l'activité de Rac1 par son interaction avec TIAM1, un mécanisme parfois retrouvé dans les cascades d'activation des petites GTPases. Dans tous les cas, des expériences supplémentaires devront être réalisées pour confirmer cette interaction et explorer la nature de celle-ci.

PARD3 est une protéine adaptatrice possédant de nombreux domaines et partenaires d'interaction. Elle possède trois domaines PDZ, caractérisés par leur capacité à interagir avec certaines séquences consensus de trois à quatre acides aminés présents en C-terminal de leur protéines cibles. L'un de ces domaines PDZ permet également son interaction avec la tête phosphatidyloinositol des lipides membranaires. Cette protéine possède une séquence d'oligomérisation en N-terminal et prend part à la formation de divers complexes protéiques. De concert avec PARD6, la protéine kinase PRCKI ainsi que la GTPase CDC42 activée, elle mène à l'assemblage du complexe Par, nécessaire à la formation de jonction serrées et de jonctions cellule-cellule (Joberty et al., 2000). PARD3 peut également s'associer avec la protéine TIAM1, présentée précédemment. Comme on peut l'observer dans le Tableau 3, son enrichissement par rapport au contrôle est important. Il serait intéressant d'en apprendre davantage sur la nature de cette interaction potentielle.

SCAMP2 et SCAMP3 sont des protéines à quatre domaines transmembranaires qui sont enrichies dans les endosomes de recyclage (Diering et al., 2009). Elles participent au recyclage à la membrane plasmique de l'échangeur sodium/hydrogène 5 NHE5. L'information disponible quant à leur rôle biologique et leur interacteurs protéiques est

non-exhaustive, il serait donc intéressant d'évaluer la nature de l'interaction potentielle que ces protéines présentent envers Rab4.

SASH1 est une protéine impliquée dans la signalisation NF-kappa-B. Elle agit également en tant que protéine échafaud, liant les protéines IQGAP1 et Cadherine-E (Zhou et al., 2013), toutes deux possédant une affinité pour la GTPase CDC42. Elle s'associe également avec la protéine Gαs. Les taux d'enrichissement de SASH1 dans les conditions avec la Rab4-WT et la Rab4-S22N sont très élevés, mais sous le seuil pour la condition Rab4-Q67L, suggérant une affinité différentielle pour les deux états d'activation de Rab4. Des expériences ultérieures devront être réalisées pour évaluer la nature de cet enrichissement protéique.

Les protéines PHB, VPS13C et MRPL11 sont toutes des protéines impliquées dans l'intégrité mitochondriale. Les résultats extraits des expériences de MS réalisées présentent de nombreuses protéines mitochondriales ayant un enrichissement de loin supérieur au contrôle négatif. Nous trouvons intéressant que ces protéines mitochondriales soient aussi prépondérantes. Nous soulevons la possibilité d'un rôle de Rab4 dans l'homéostasie mitochondriale. De plus, Rab4 (Talaber et al., 2014) et Rab5 (Hsu et al., 2018) ont été observées chez les mitochondries par microscopie confocale.

La méthodologie que nous avons adoptée n'est pas une approche globale, mais plutôt un outil préliminaire permettant de filtrer la panoplie de protéines identifiées dans l'échantillon afin d'en extraire quelques interacteurs potentiels, lesquels feront l'objet d'une investigation plus rigoureuse dans les travaux postérieurs à cet ouvrage. Nous aimerions souligner qu'il existe d'autres méthodologies plus puissantes qui auraient pu mener à des résultats plus robustes, notamment l'approche de biotinylation par proximité BioID (Roux et al., 2018), laquelle limite la non-spécificité des ensembles de protéines récoltées via un marquage spatiotemporel de celles-ci. Néanmoins, nous sommes satisfaits d'avoir pu dresser une liste non-exhaustive d'interacteurs potentiels de Rab4 et de ses mutants.

CONCLUSION

Globalement, les travaux effectués nous ont permis d'en apprendre davantage sur Rab4 et l'inhibition de son activation, médiée par L-PGDS, qui est conférée par les peptides dérivés de sa séquence. Une gamme de peptides inspirés de la séquence d'interaction Rab4/L-PGDS a été synthétisée. Nous avons pu mettre sur pied une gamme de méthodes visant à quantifier leur effet sur Rab4. Nous avons pu en extraire des informations pertinentes quant aux acides aminés qui sont cruciaux à cette interaction, tant chez Rab4 que chez nos composés peptidiques. Nous avons entamé le développement d'un biosenseur FRET de Rab4, lequel permettra ultimement de sonder l'état de chargement nucléotidique de Rab4 en cellule. Nous avons également procédé à des expériences de spectrométrie de masse de Rab4 et de ses mutants S22N et Q67L, dominant négatif et constitutivement actif, respectivement. Ceci nous a permis d'identifier quelques partenaires d'interaction potentiel, lesquels pourront servir de point de départ pour un autre volet du projet.

PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma maîtrise pourront servir de point de départ pour le design et la synthèse d'une deuxième ronde de composés visant à affecter Rab4 dans son chargement nucléotidique. Étant donné la multidisciplinarité et l'ampleur du projet, nous espérons que la relève pourra approfondir les connaissances acquises, via la réalisation d'expériences de RMN avec les différents peptides et la caractérisation de l'affinité de ceux-ci par ITC. La complétion du biosenseur FRET de Rab4 serait un atout puissant pour la caractérisation cellulaire de l'effet des peptides des générations futures, lesquels posséderont de meilleures propriétés pharmacologiques, sur la survie cellulaire et la métastase. De plus, un modèle animal permettant de quantifier l'effet des composés sur la progression et la régression tumorale a été mis sur pied, les étapes subséquentes du développement d'inhibiteurs de l'activation de Rab4 étant prêtes, mais dépendantes des étapes précédentes de développement de composés avec des propriétés pharmacologiques permettant la pénétration membranaire.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Barr, F. A. (2013). Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential? In *Journal of Cell Biology* (Vol. 202, Issue 2, pp. 191–199). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306010>
- Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., & Oprea, T. I. (2016). BDDCS, the Rule of 5 and drugability. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 101, pp. 89–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.007>
- Binda, C., Génier, S., Cartier, A., Larrivée, J. F., Stankova, J., Young, J. C., & Parent, J. L. (2014). A G protein-coupled receptor and the intracellular synthase of its agonist functionally cooperate. *Journal of Cell Biology*, 204(3), 377–393. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304015>
- Binda, C., Génier, S., Degrandmaison, J., Picard, S., Fréchette, L., Jean, S., Marsault, E., & Parent, J. L. (2019). L-type prostaglandin D synthase regulates the trafficking of the PGD₂ DP1 receptor by interacting with the GTPase Rab4. *Journal of Biological Chemistry*, 294(45), 1665–16883. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008233>
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. In *Cell* (Vol. 129, Issue 5, pp. 865–877). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
- Brighouse, A., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2010a). Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, Issue 20, pp. 3449–3465). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>
- Brighouse, A., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2010b). Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, Issue 20, pp. 3449–3465). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>
- Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., & Chavrier, P. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 32, pp. 555–576). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125227>
- Chan, P. C., Chen, S. Y., Chen, C. H., & Chen, H. C. (2006). Crosstalk between hepatocyte

- growth factor and integrin signaling pathways. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 13, Issue 2, pp. 215–223). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9061-7>
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1), 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>
- Cherfils, Jacqueline, & Zeghouf, M. (2011). Chronicles of the GTPase switch. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 7, Issue 8, pp. 493–495). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.608>
- Cherfils, Jacqueline, & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1), 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 13, Issue 11, pp. 828–851). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4389>
- Diering, G. H., Church, J., & Numata, M. (2009). Secretory carrier membrane protein 2 regulates cell-surface targeting of brain-enriched Na⁺/H⁺ exchanger NHE5. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13892–13903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807055200>
- Dong, C., Yang, L., Zhang, X., Gu, H., Lam, M. L., Claycomb, W. C., Xia, H., & Wu, G. (2010). Rab8 interacts with distinct motifs in α2B- and β2-adrenergic receptors and differentially modulates their transport. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20369–20380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081521>
- Frittoli, E., Palamidessi, A., Marighetti, P., Confalonieri, S., Bianchi, F., Malinverno, C., Mazzaro, G., Viale, G., Martin-Padura, G., Garré, M., Parazzoli, D., Mattei, V., Cortellino, S., Bertalot, G., Di Fiore, P. P., & Scita, G. (2014). A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *Journal of Cell Biology*, 206(2), 307–328. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403127>
- Gabe Lee, M. T., Mishra, A., & Lambright, D. G. (2009). Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by Rab GTPases. In *Traffic* (Vol. 10, Issue 10, pp. 1377–1389). Traffic. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00942.x>

- Génier, S., Létourneau, D., Gauthier, E., Picard, S., Boisvert, M., Parent, J. L., & Lavigne, P. (2020). In-depth NMR characterization of Rab4a structure, nucleotide exchange and hydrolysis kinetics reveals an atypical GTPase profile. *Journal of Structural Biology*, 212(1), 107582. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107582>
- Gilman, A. G. (1987). G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 615–649. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003151>
- Gordon S. Rule and T. Kevin Hitchens. (2006). Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. In *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3500-4>
- Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(9), 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>
- Gräslund, A., Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., & Futaki, S. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. In *Journal of Biophysics* (Vol. 2011). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>
- Guerra, F., & Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*, 5(3), 34. <https://doi.org/10.3390/cells5030034>
- Hamelin, E., Thériault, C., Laroche, G., & Parent, J. L. (2005). The intracellular trafficking of the G protein-coupled receptor TPβ depends on a direct interaction with Rab11. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36195–36205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503438200>
- Hanson, P. I., & Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: Have engine, will work. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 7, pp. 519–529). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1684>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Hodgson, L., Shen, F., & Hahn, K. (2010). Biosensors for Characterizing the Dynamics of Rho Family GTPases in Living Cells. In *Current Protocols in Cell Biology: Vol. Chapter 14* (p. Unit 14.11.1-26). John Wiley & Sons, Inc.

<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1411s46>

- Hsu, F. S., Spann, S., Ferguson, C., Hyman, A. A., Parton, R. G., & Zerial, M. (2018). Rab5 and Alsln regulate stress-activated cytoprotective signaling on mitochondria. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32282>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. In *Physiological Reviews* (Vol. 91, Issue 1, pp. 119–149). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Jean, S., Cox, S., Schmidt, E. J., Robinson, F. L., & Kiger, A. (2012). Sbf/MTMR13 coordinates PI(3)P and Rab21 regulation in endocytic control of cellular remodeling. *Molecular Biology of the Cell*, 23(14), 2723–2740. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0375>
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., & Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(8), 531–539. <https://doi.org/10.1038/35019573>
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: A busy sorting station for proteins at the crossroads. In *Histology and Histopathology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 99–112). NIH Public Access. <https://doi.org/10.14670/HH-25.99>
- Kaddai, V., Gonzalez, T., Keslair, F., Grémeaux, T., Bonnafe, S., Gugenheim, J., Tran, A., Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Cormont, M. (2009). Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005257>
- Kälin, S., Hirschmann, D. T., Buser, D. P., & Spiess, M. (2015). Rabaptin5 is recruited to endosomes by Rab4 and Rabex5 to regulate endosome maturation. *Journal of Cell Science*, 128(22), 4126–4137. <https://doi.org/10.1242/jcs.174664>
- Langbeheim, H., Shih, T. Y., & Scolnick, E. M. (1980). Identification of a normal vertebrate cell protein related to the p21 src of harvey murine sarcoma virus. *Virology*, 106(2), 292–300. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90252-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90252-4)
- Linder, S., Wiesner, C., & Himmel, M. (2011). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 185–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216>
- Marat, A. L., & Haucke, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-phosphates—at the interface

- between cell signalling and membrane traffic. *The EMBO Journal*, 35(6), 561–579. <https://doi.org/10.15252/emj.201593564>
- Marcus, K., & Mattos, C. (2020). Water in Ras Superfamily Evolution. *Journal of Computational Chemistry*, 41(5), 402–414. <https://doi.org/10.1002/jcc.26060>
- Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., & De Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature Genetics*, 25(2), 173–176. <https://doi.org/10.1038/76024>
- Mercier, E., Girodat, D., & Wieden, H. J. (2015). A conserved P-loop anchor limits the structural dynamics that mediate nucleotide dissociation in EF-Tu. *Scientific Reports*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep07677>
- Minard, M. E., Ellis, L. M., & Gallick, G. E. (2006). Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 23(5–6), 301–313. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9040-z>
- Naslavsky, N., Boehm, M., Backlund, P. S., & Caplan, S. (2004). Rabenosyn-5 and EHD1 Interact and Sequentially Regulate Protein Recycling to the Plasma Membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2410–2422. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-10-0733>
- Navaroli, D. M., Bellvé, K. D., Standley, C., Lifshitz, L. M., Cardia, J., Lambright, D., Leonard, D., Fogarty, K. E., & Corvera, S. (2012). Rabenosyn-5 defines the fate of the transferrin receptor following clathrin-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115495109>
- Pan, J. Y., Sanford, J. C., & Wessling-Resnick, M. (1995). Effect of Guanine Nucleotide Binding on the Intrinsic Tryptophan Fluorescence Properties of Rab5. *Journal of Biological Chemistry*, 270(41), 24204–24208. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.24204>
- Papathodorou, I., Fonseca, N. A., Keays, M., Tang, Y. A., Barrera, E., Bazant, W., Burke, M., Füllgrabe, A., Fuentes, A. M. P., George, N., Huerta, L., Koskinen, S., Mohammed, S., Geniza, M., Preece, J., Jaiswal, P., Jarnuczak, A. F., Huber, W., Stegle, O., ... Petryszak, R. (2018). Expression Atlas: Gene and protein expression

- across multiple studies and organisms. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D246–D251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1158>
- Purvanov, V., Koval, A., & Katanaev, V. L. (2010). A direct and functional interaction between Goand Rab5 during G protein-coupled receptor signaling. *Science Signaling*, 3(136). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000877>
- Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I. M., & Houdusse, A. (2018). Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. In *Small GTPases* (Vol. 9, Issues 1–2, pp. 22–48). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1336191>
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., & Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 585–590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209548200>
- Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., & Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 196, Issue 2, pp. 189–201). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103008>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B., & May, D. G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), 19.23.1-19.23.15. <https://doi.org/10.1002/cpps.51>
- Scolnick, E. M., Papageorge, A. G., & Shih, T. Y. (1979). Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5355–5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5355>
- Seaman, M. N. J. (2012). The retromer complex-endosomal protein recycling and beyond. In *Journal of Cell Science* (Vol. 125, Issue 20, pp. 4693–4702). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.103440>
- Shih, T. Y., Weeks, M. O., Young, H. A., & Scolnick, E. M. (1979). p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *Journal of Virology*, 31(2).
- Shinde, S. R., & Maddika, S. (2018). Post translational modifications of Rab GTPases. In

- Small GTPases* (Vol. 9, Issues 1–2, pp. 49–56). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1299270>
- Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., Oksvold, P., Edfors, F., Limiszewska, A., Hikmet, F., Huang, J., Du, Y., Lin, L., Dong, Z., Yang, L., Liu, X., Jiang, H., Xu, X., Wang, J., ... Mulder, J. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*, 367(6482). <https://doi.org/10.1126/science.aay4106>
- Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. In *Genome Biology* (Vol. 2, Issue 5, p. reviews3007.1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews3007>
- Stouten, P. F. W., Sander, C., Wittinghofer, A., & Valencia, A. (1993). How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Letters*, 320(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81644-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81644-F)
- Suzuki, N., Hajicek, N., & Kozasa, T. (2009). Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. In *NeuroSignals* (Vol. 17, Issue 1, pp. 55–70). Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000186690>
- Talaber, G., Miklossy, G., Oaks, Z., Liu, Y., Tooze, S. A., Chudakov, D. M., Banki, K., & Perl, A. (2014). HRES-1/Rab4 Promotes the Formation of LC3+ Autophagosomes and the Accumulation of Mitochondria during Autophagy. *PLoS ONE*, 9(1), e84392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084392>
- Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G. M., Huxley, C., & Seabra, M. C. (2004). A General Role for Rab27a in Secretory Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1), 332–344. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0452>
- Toma-Fukai, S., & Shimizu, T. (2019). Structural insights into the regulation mechanism of small GTPases by GEFs. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24183308>
- Uhlen, M., Karlsson, M. J., Zhong, W., Tebani, A., Pou, C., Mikes, J., Lakshmikanth, T., Forsström, B., Edfors, F., Odeberg, J., Mardinoglu, A., Zhang, C., von Feilitzen, K., Mulder, J., Sjöstedt, E., Hober, A., Oksvold, P., Zwahlen, M., Ponten, F., ... Brodin, P. (2019). A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science*, 366(6472). <https://doi.org/10.1126/science.aax9198>

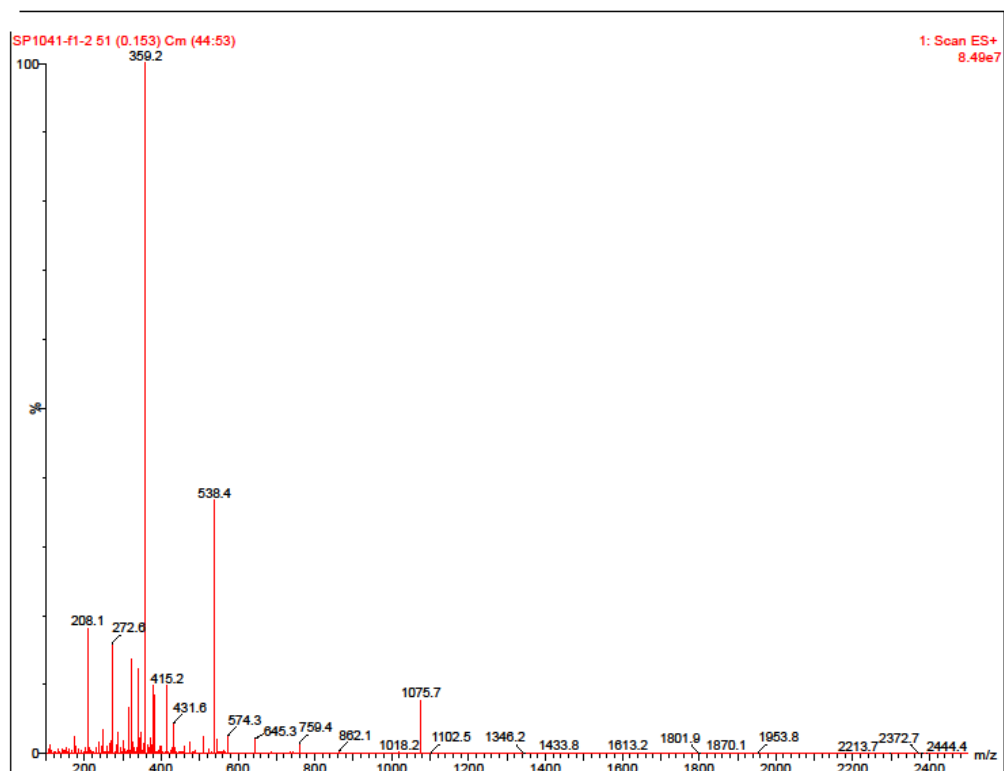
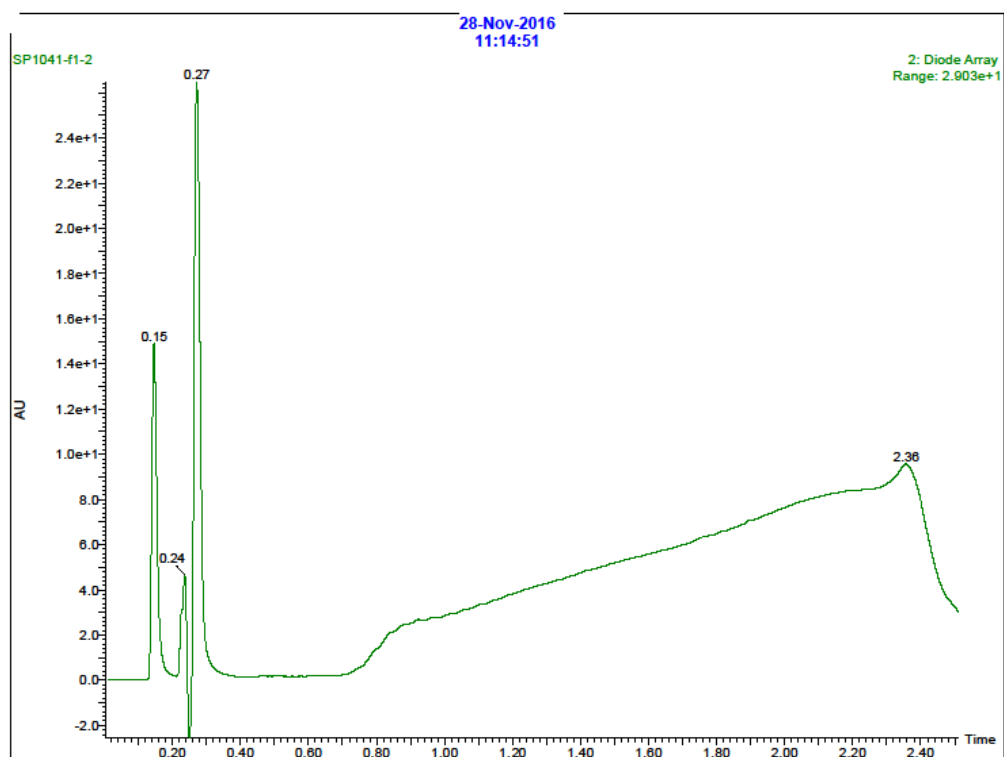
- Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Wagner, K., Hartung, H. P., & Timmerman, V. (2003). Mutations in the small GTPase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, 72(3), 722–727. <https://doi.org/10.1086/367847>
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. In *Science* (Vol. 294, Issue 5545, pp. 1299–1304). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P. Ö., McCaffrey, M., Stenmark, H., & Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound rab4 and rab5. *EMBO Journal*, 17(7), 1941–1951. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.1941>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(5), 843–846. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>
- Yan, C., & Theodorescu, D. (2018). RAL GTPases: Biology and Potential as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014415>
- Yoshida-Amano, Y., Hachiya, A., Ohuchi, A., Kobinger, G. P., Kitahara, T., Takema, Y., & Fukuda, M. (2012). Essential role of RAB27A in determining constitutive human skin color. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041160>
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 107–117). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35052055>
- Zhen, Y., & Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(17), 3171–3176. <https://doi.org/10.1242/jcs.166074>
- Zhou, D., Wei, Z., Deng, S., Wang, T., Zai, M., Wang, H., Guo, L., Zhang, J., Zhong, H., He, L., & Xing, Q. (2013). SASH1 regulates melanocyte transepithelial migration through a novel Gαs-SASH1-IQGAP1-E-Cadherin dependent pathway. *Cellular Signalling*, 25(6), 1526–1538. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.12.025>

ANNEXE 1 : FICHES DE CARACTÉRISATION

Code du composé : SP1041 (Scramble 85-92 LPGDS)

5 Décembre 2016

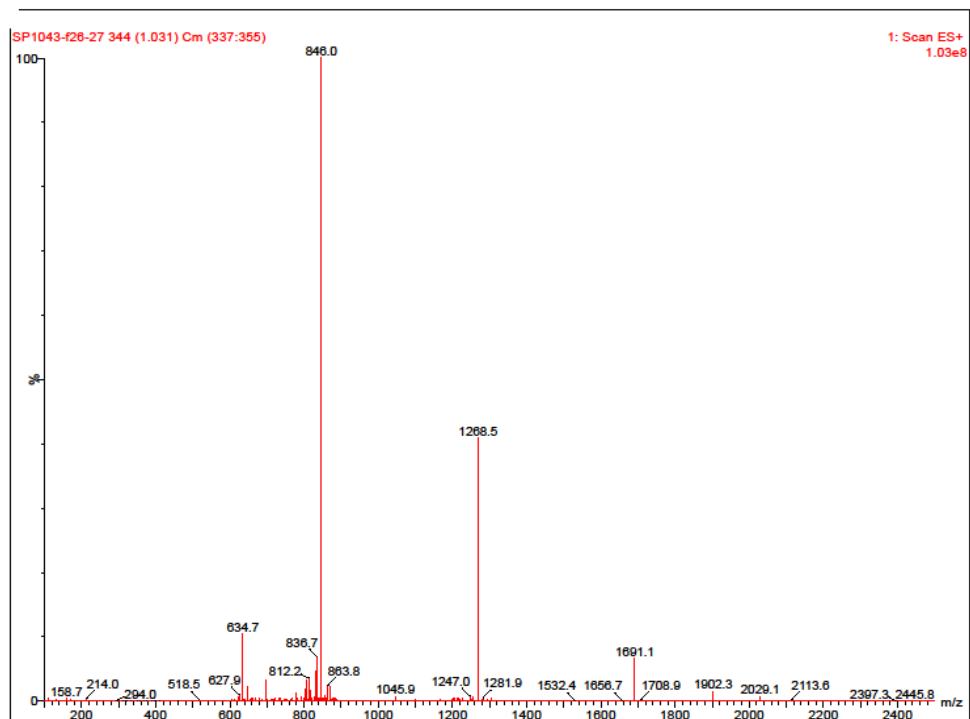
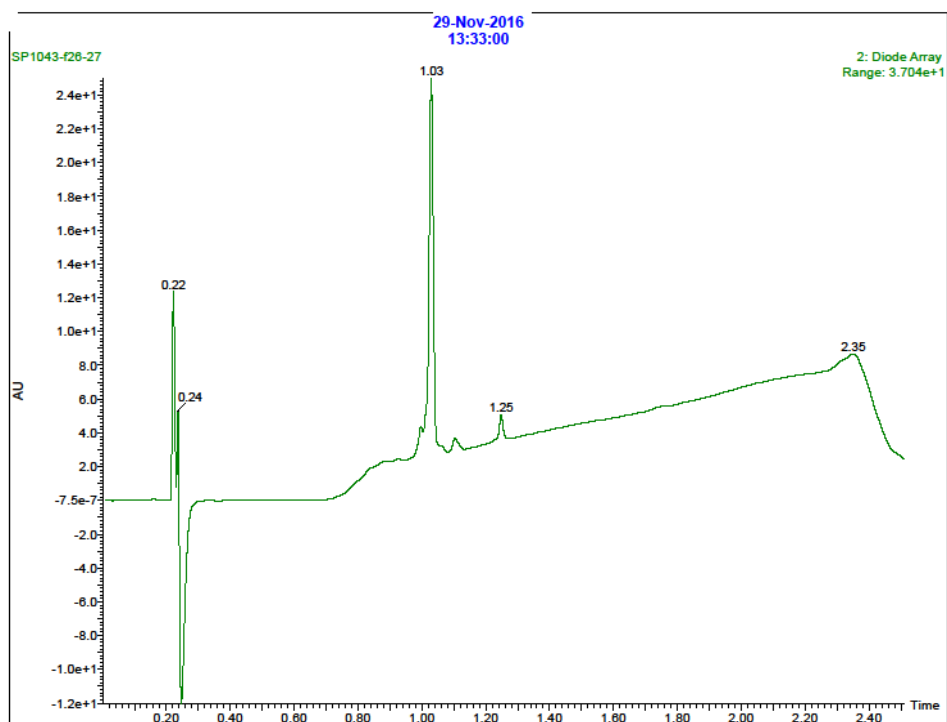
Structure du composé : Ac- QRCNTEKR -NH ₂ Scramble 85-92 LPGDS	
Projet : Chantal Binda Solubilité : Soluble dans H ₂ O, très polaire.	
Spectrométrie de masse Formule brute du composé : C ₄₁ H ₇₄ N ₁₈ O ₁₄ S ₁	
Masse attendue : 1075.21	Masse obtenue : 1075.21 (M+1) 538.4 (M+2)/2 359.2 (M+3)/3 (majoritaire)
Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm. Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min Temps de rétention du produit : 0.15 minutes Pureté PDA : >90 %	
Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation. Quantité de peptide : 24.9 mg	



Code du composé : SP1043 (Séquence 75-98 LPGDS)

5 Décembre 2016

Structure du composé : Ac- NLTSTFLRKNQCETRTMLLQP -NH ₂ Séquence 75-98 LPGDS Projet : Chantal Binda Solubilité : Soluble dans 20% ACN, relativement polaire.	
Spectrométrie de masse Formule brute du composé : C ₁₀₈ H ₁₈₃ N ₃₃ O ₃₃ S ₂	
Masse attendue : 2535.95	Masse obtenue : 1691.1 (M+3)/2 1268.5 (M+2)/2 846.0 (M+3)/3 (majoritaire) 634.7 (M+4)/4
Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm. Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min Temps de rétention du produit : 1.03 minutes Pureté PDA : >85 %	
Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation. Quantité de peptide : 12.1 mg	



Code du composé : SP1045 (Scramble 75-98 LPGDS)

5 Décembre 2016

Structure du composé : Ac- LEQNLRLLRKMTPTTNTSCFQ -NH₂
Scramble 75-98 LPGDS

Projet : Chantal Binda

Solubilité : Soluble dans 20% ACN, relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₁₀₈H₁₈₃N₃₃O₃₃S₂

Masse attendue : 2535.95	Masse obtenue : 1691.1 (M+3)/2
	1268.5 (M+2)/2
	846.0 (M+3)/3 (majoritaire)
	634.7 (M+4)/4

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

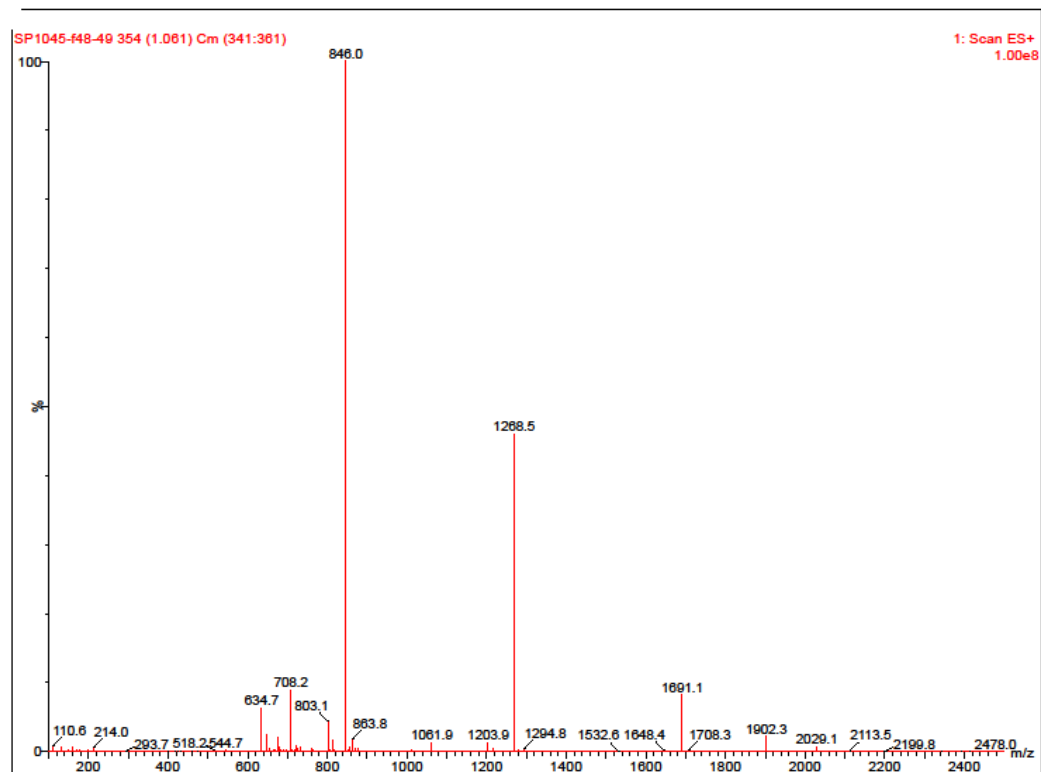
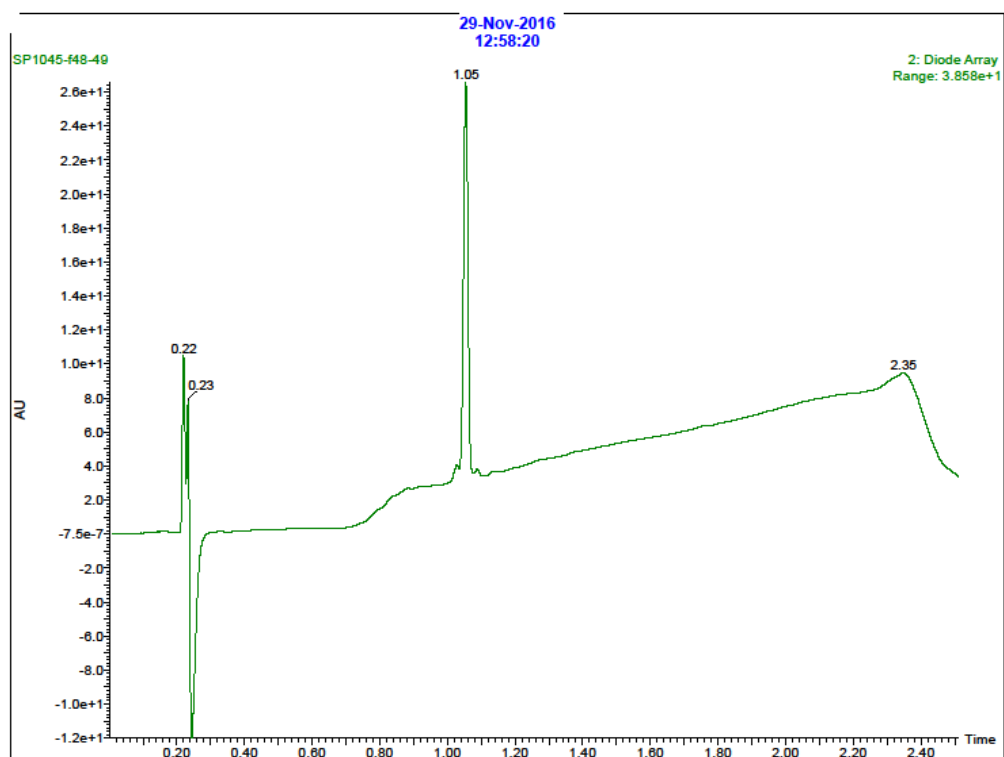
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 1.05 minutes

Pureté PDA : >95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

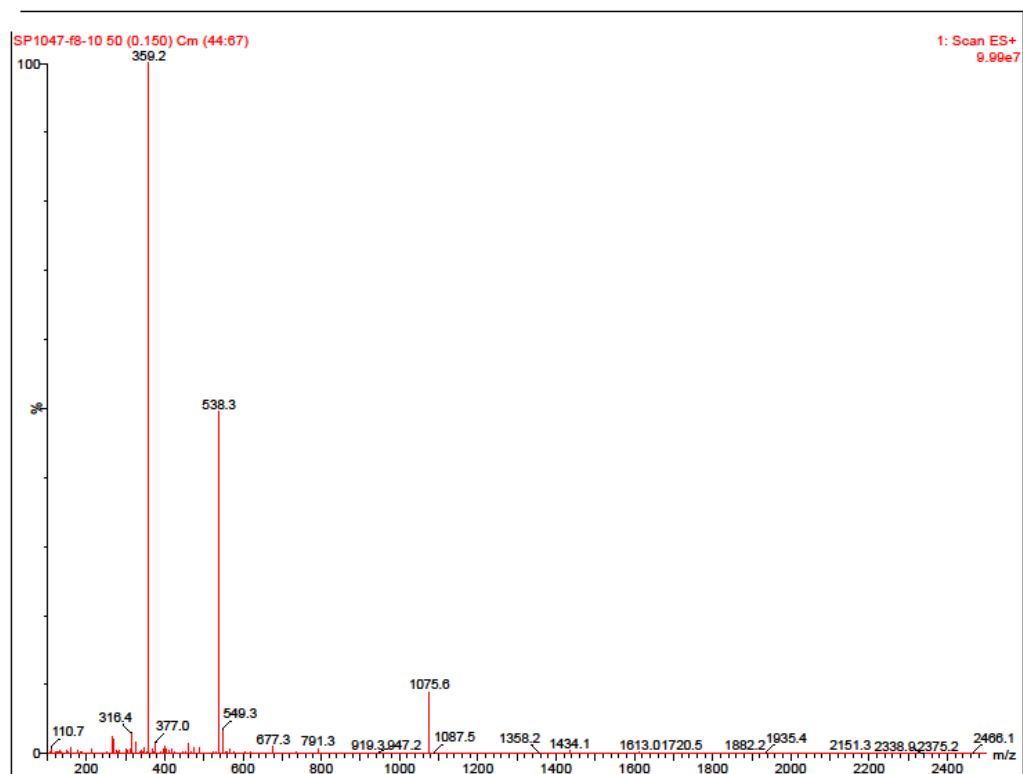
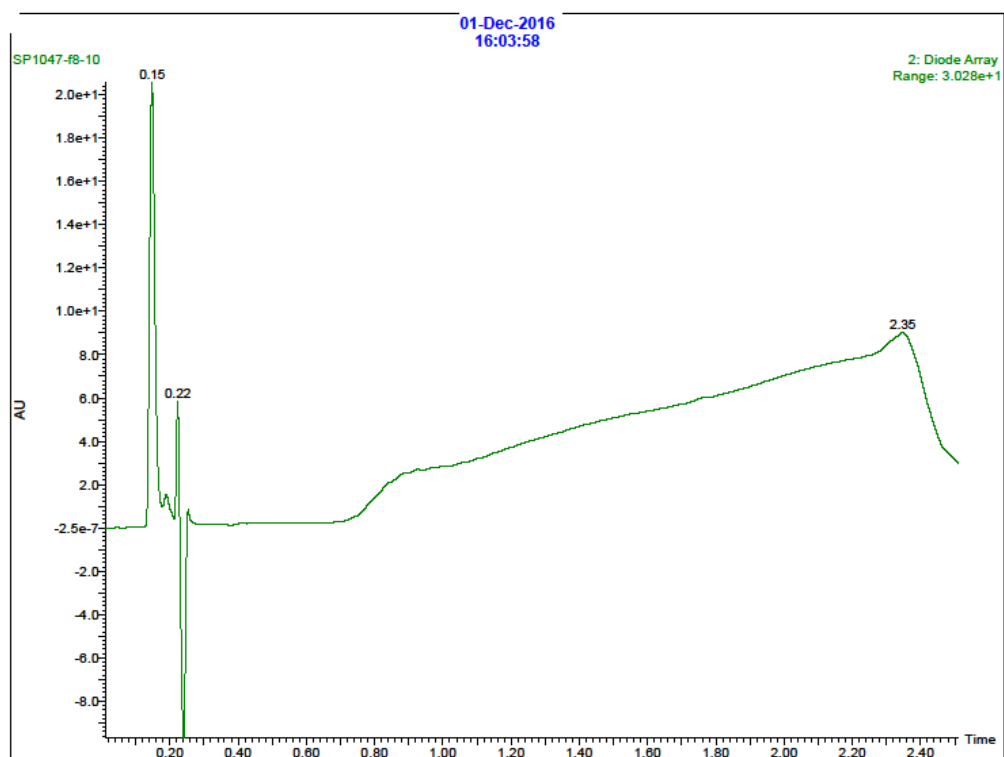
Quantité de peptide : 10.9 mg



Code du composé : SP1047 (Séquence 85-92 LPGDS)

5 Décembre 2016

<p>Structure du composé : Ac- RKNQCETR -NH₂ Séquence 85-92 LPGDS</p> <p>Projet : Chantal Binda</p> <p>Solubilité : Soluble dans H₂O, très polaire.</p>	
<p>Spectrométrie de masse</p> <p>Formule brute du composé : C₄₁H₇₄N₁₈O₁₄S₁</p>	
Masse attendue : 1075.21	<p>Masse obtenue : 1075.21 (M+1)</p> <p>538.4 (M+2)/2</p> <p>359.2 (M+3)/3 (majoritaire)</p>
<p>Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.</p> <p>Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min</p> <p>Temps de rétention du produit : 0.15 minutes</p> <p>Pureté PDA : >90 %</p>	
<p>Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.</p> <p>Quantité de peptide : 28.0 mg</p>	



Code du composé : SP1059

8 mai 2017

Structure du composé : $\text{Ac} - \text{RKNQSETR} - \text{NH}_2$

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Cys→Ser

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₄₁H₇₄N₁₈O₁₅

Masse attendue : 1059.14	Masse obtenue : 1060.54(M+1)
	531.00 (M+2)/2 (majoritaire)
	354.63 (M+3)/3

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm.

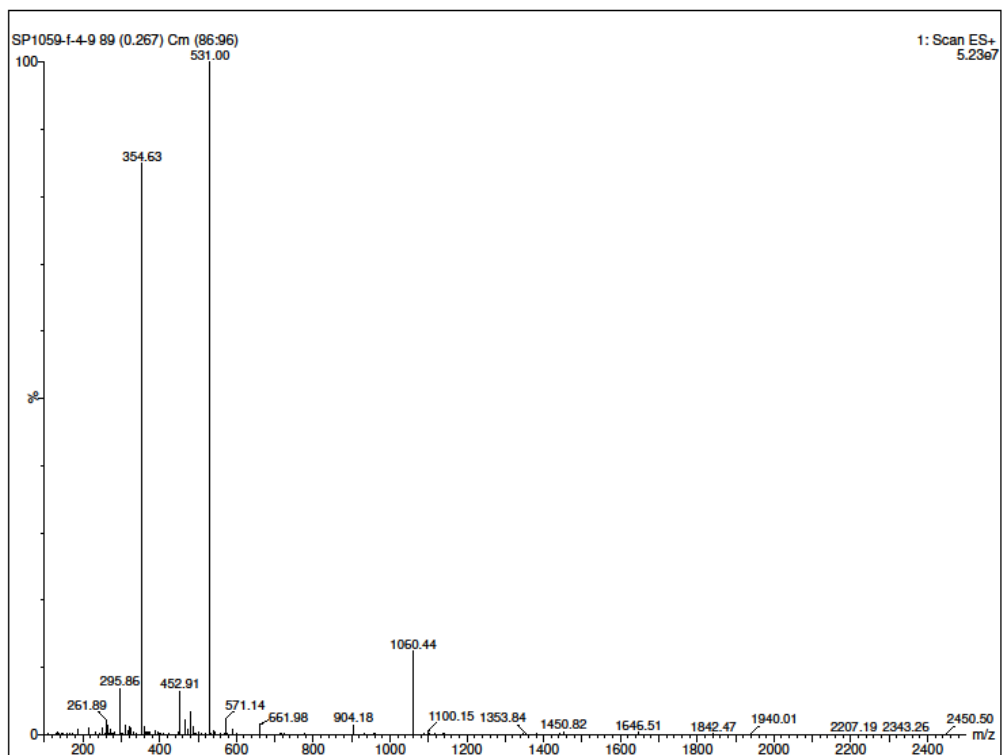
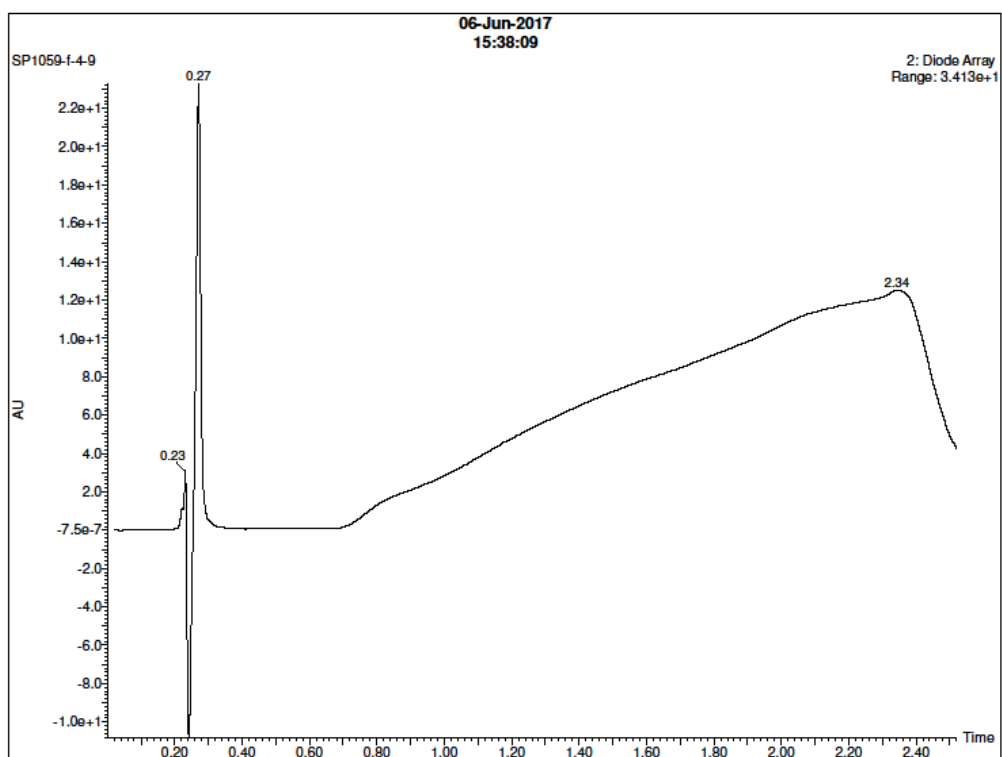
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800 μ L/min

Temps de rétention du produit : 0.27 minutes

Pureté PDA : 95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 μ mol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1061

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - **A**KNQCETR – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₃₈H₆₇N₁₅O₁₄S₁

Masse attendue : 990.10	Masse obtenue : 991.1(M+1) 496.5 (M+2)/2 (majoritaire)
-------------------------	---

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

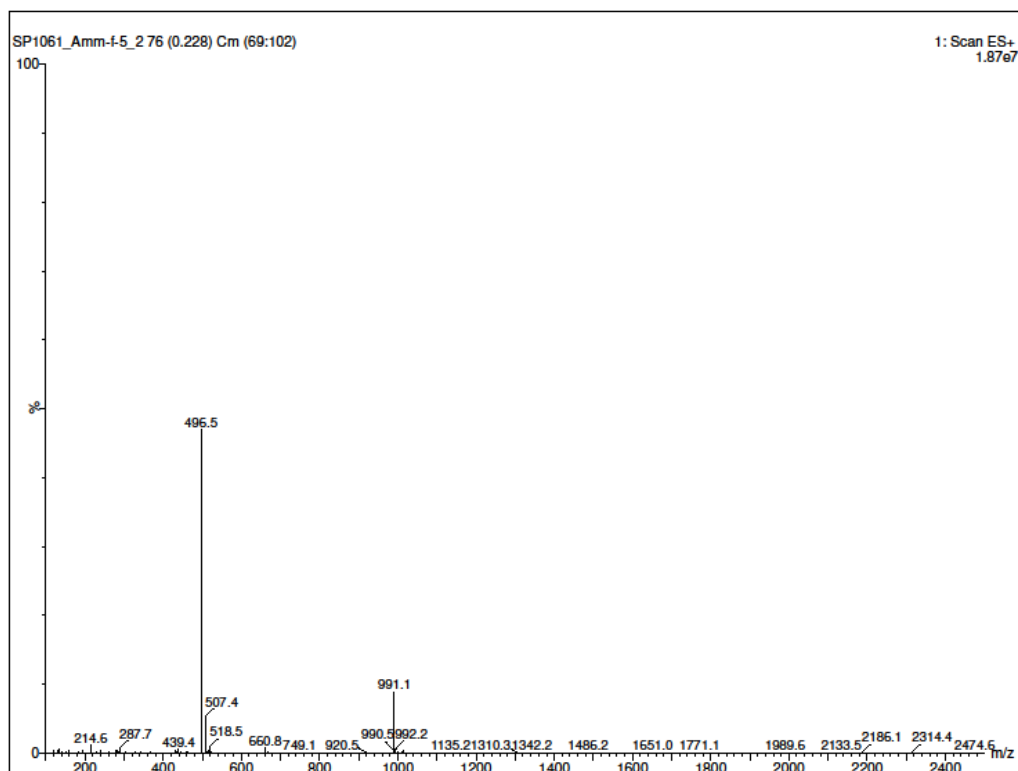
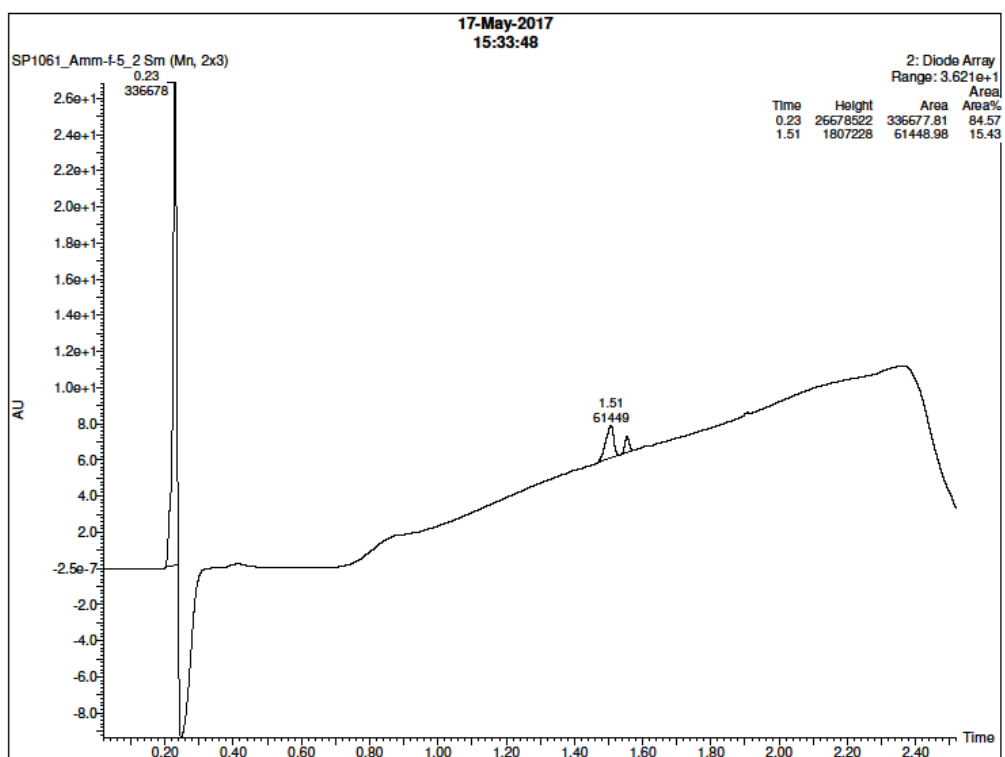
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 0.23 minutes

Pureté PDA : 85 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1063

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RANQCETR – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₄₀H₇₃N₁₇O₁₃S₁

Masse attendue : 1032.18	Masse obtenue : 1019.2 (M+1) 510.5 (M+2)/2 (majoritaire)
--------------------------	---

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

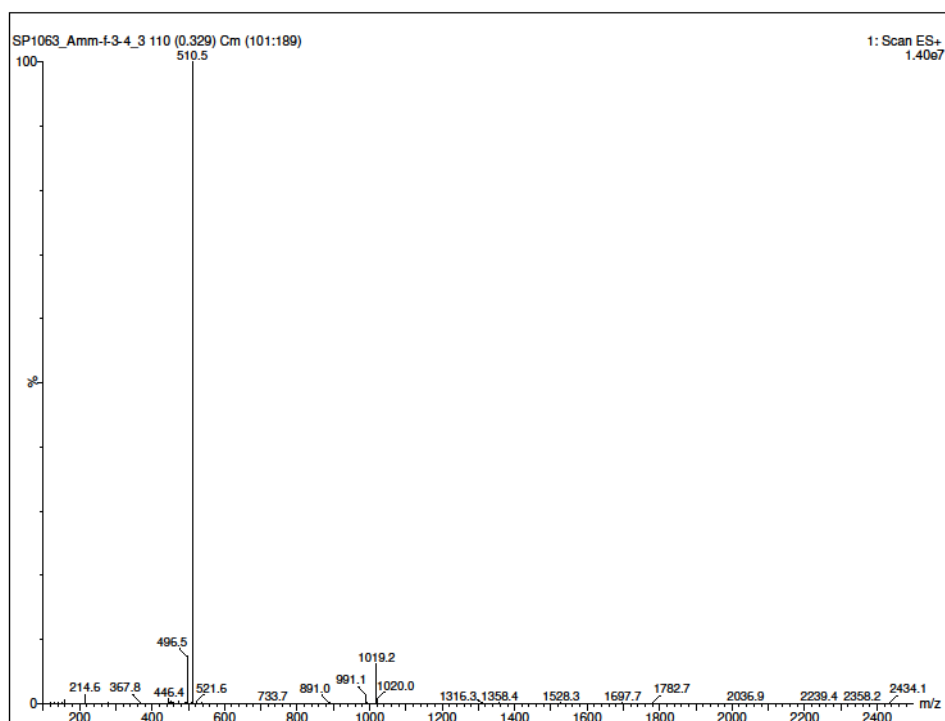
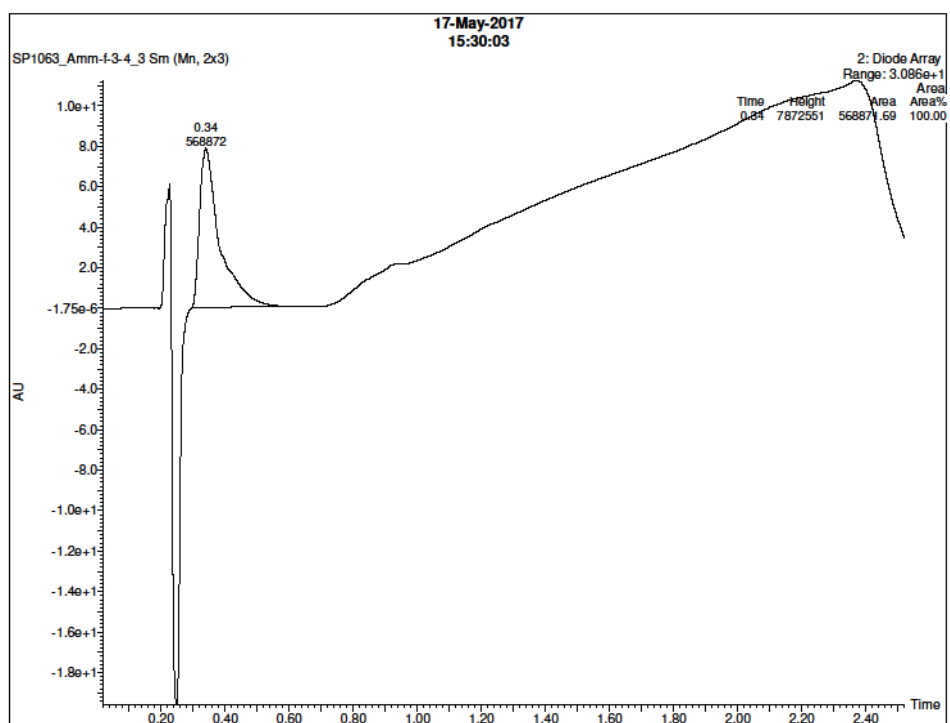
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 0.34 minutes

Pureté PDA : >90 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1065

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RK**A**QCETR – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₄₀H₇₃N₁₇O₁₃S₁

Masse attendue : 1032.18	Masse obtenue : 1032.2 (M+1)
	517.6 (M+2)/2
	345.4 (M+3)/3 (majoritaire)

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7μm, 2.1 x 50 mm.

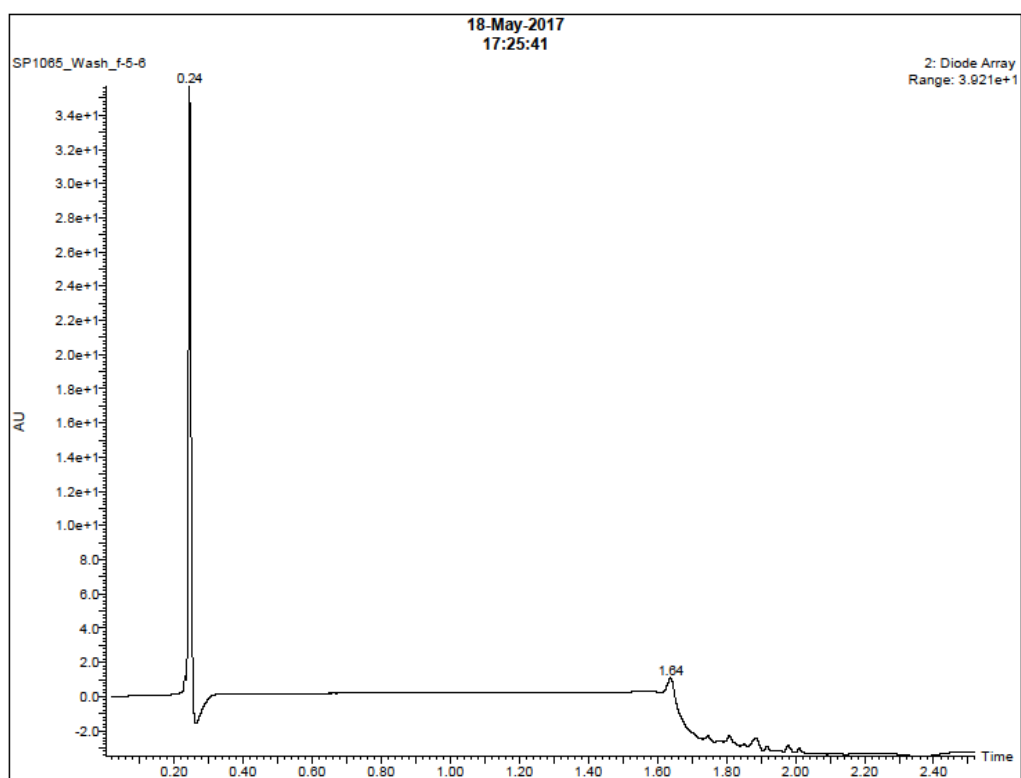
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800μL/min

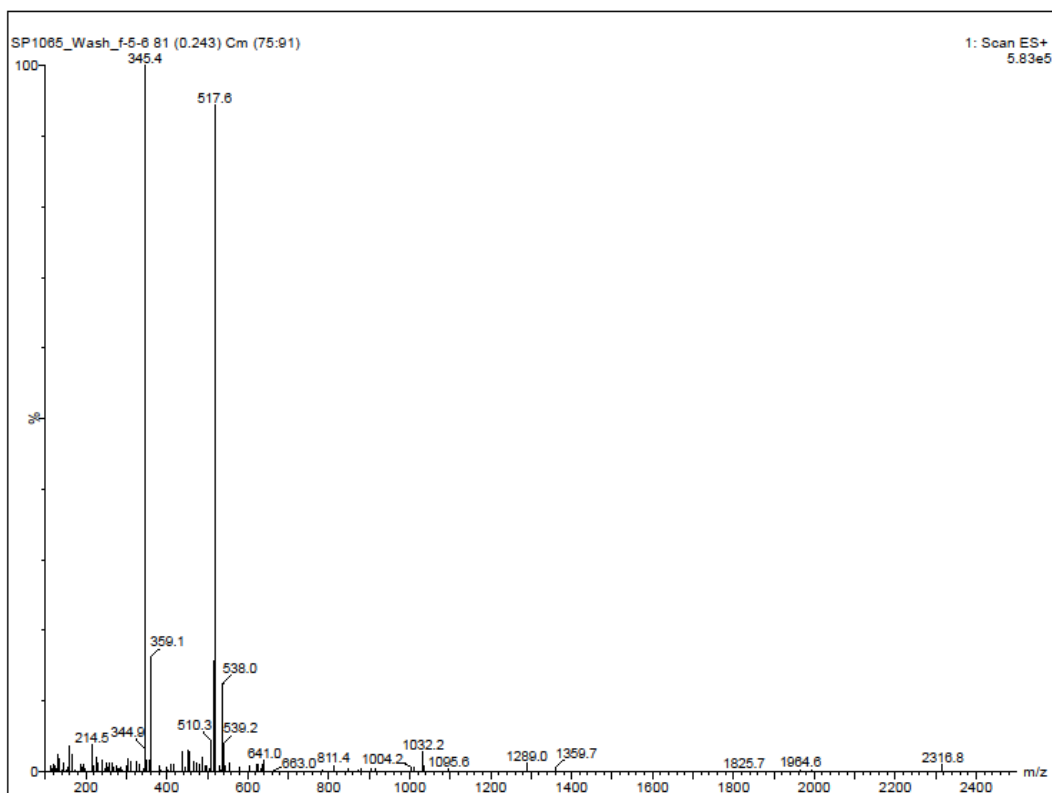
Temps de rétention du produit : 0.24 minutes

Pureté PDA : >90 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 μmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg





Code du composé : SP1067

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RKNACETR – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₃₉H₇₁N₁₇O₁₃S₁

Masse attendue : 1018.16

Masse obtenue : 1019.37 (M+1)

510.61 (M+2)/2

341.01 (M+3)/3 (majoritaire)

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm.

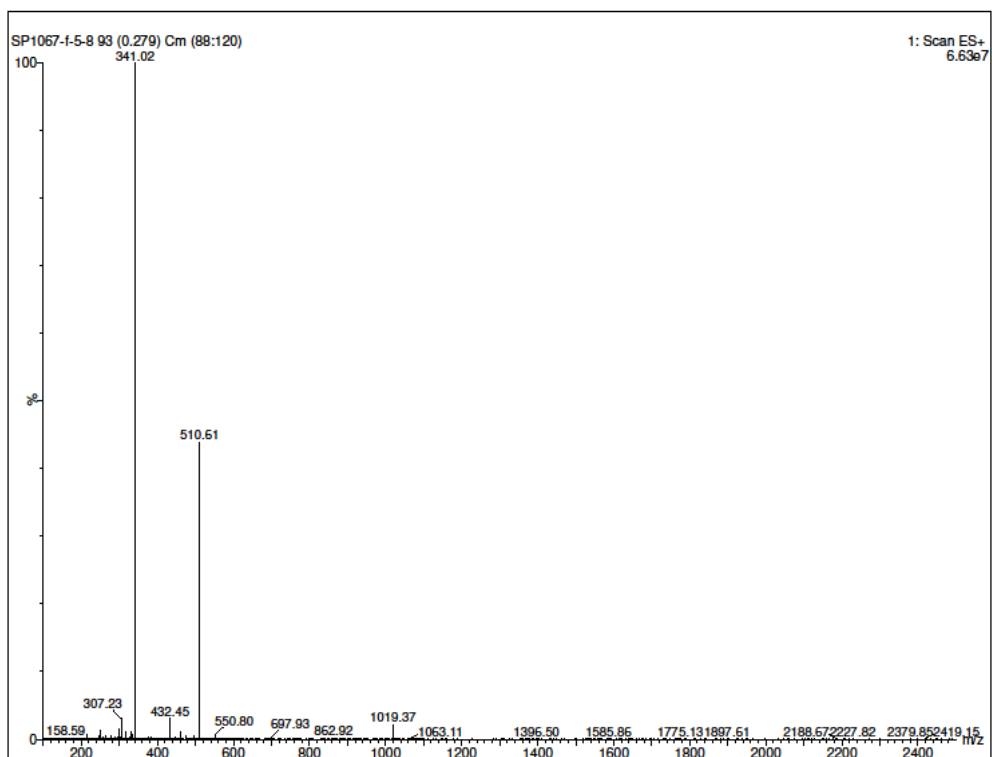
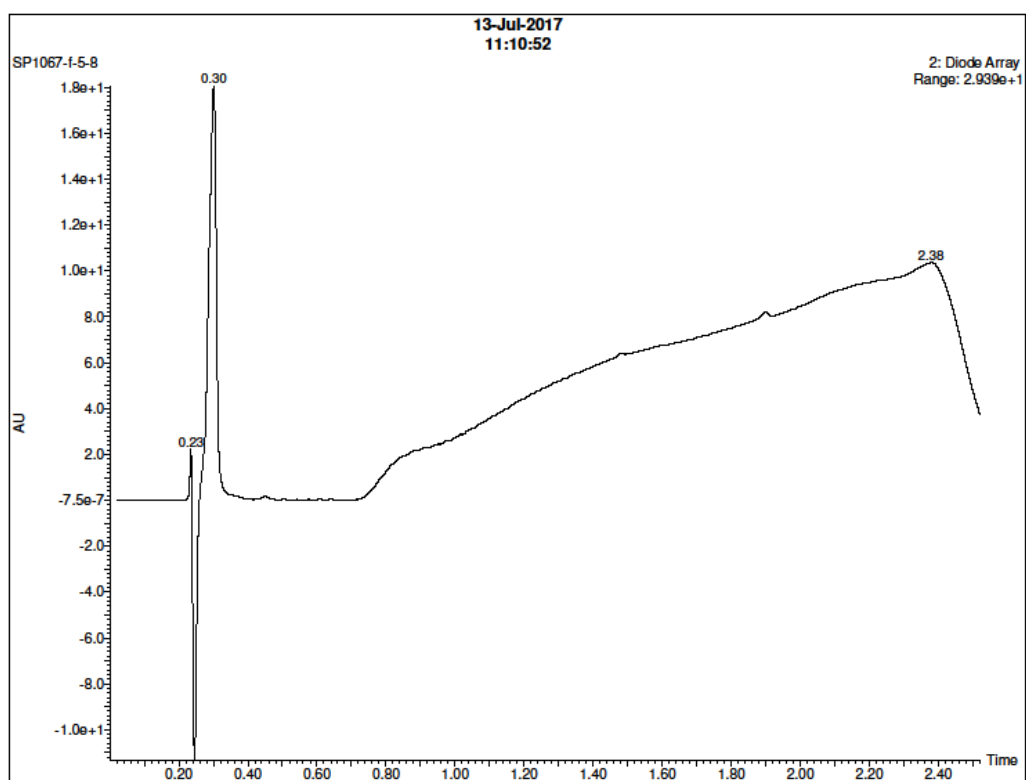
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800 μ L/min

Temps de rétention du produit : 0.30 minutes

Pureté PDA : >95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 μ mol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1069

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RKNQAETR – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₄₁H₇₄N₁₈O₁₄

Masse attendue : 1043.14	Masse obtenue : 1044.38 (M+1)
	523.01 (M+2)/2 (majoritaire)
	349.28 (M+3)/3

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

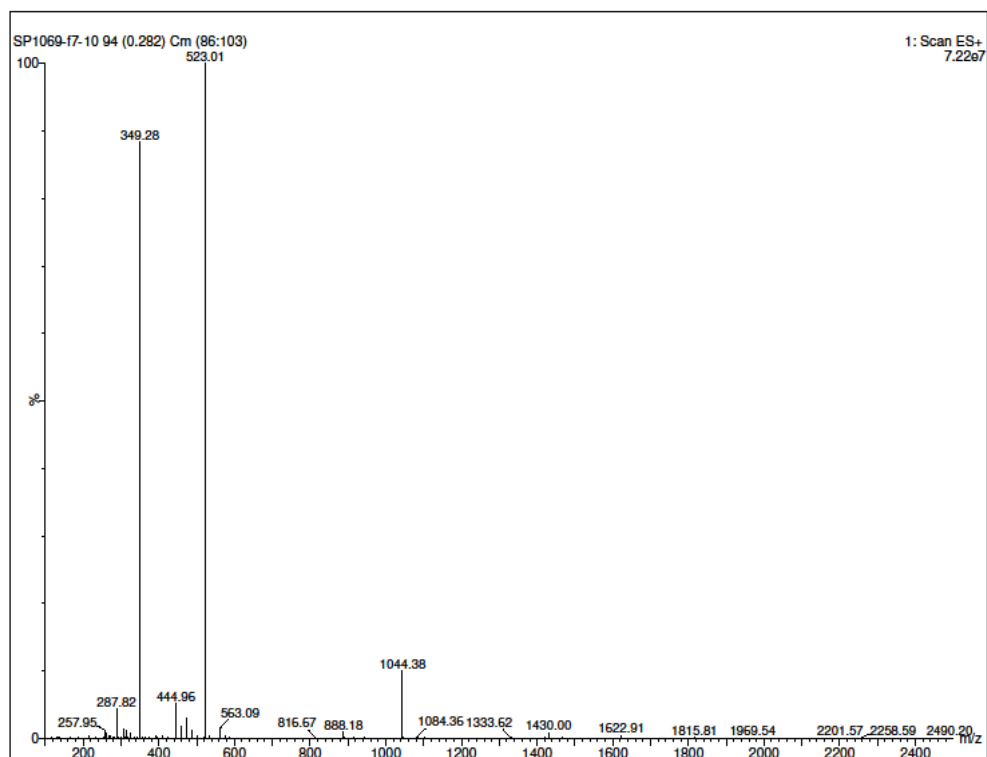
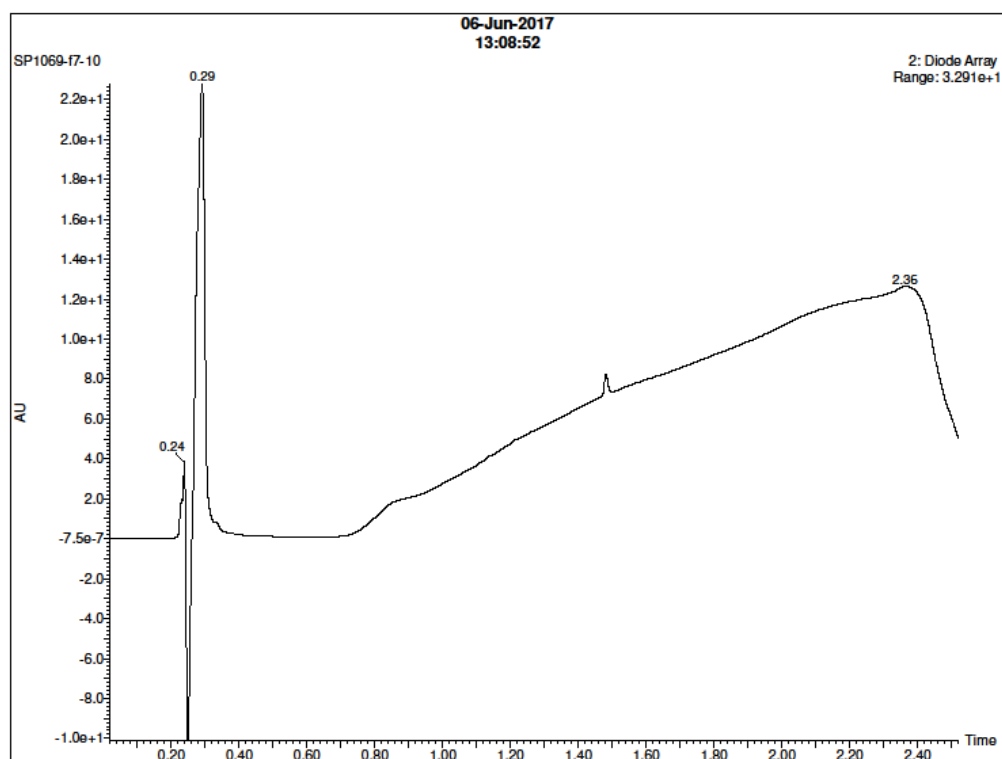
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 0.29 minutes

Pureté PDA : >95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1071

11 mai 2017

Structure du composé : $\text{Ac} - \text{RKNQCA}^{\text{TR}} - \text{NH}_2$

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₃₉H₇₂N₁₈O₁₂S₁

Masse attendue : 1017.17	Masse obtenue : 1018.18 (M+1)
	510.03 (M+2)/2 (majoritaire)
	340.62 (M+3)/3

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm.

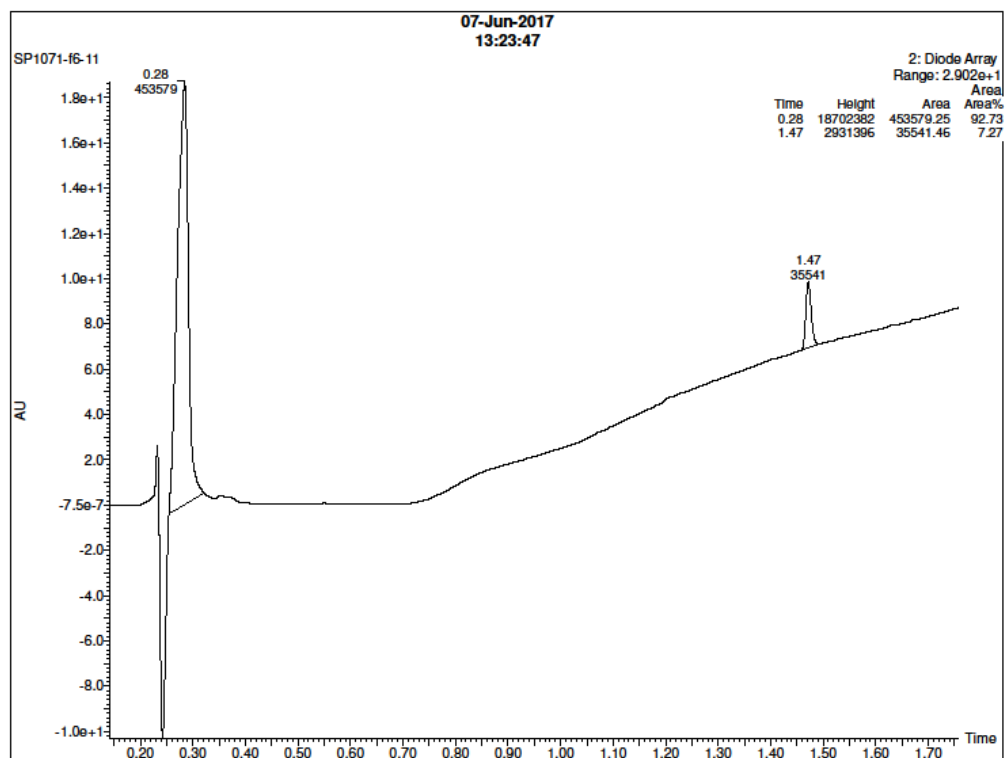
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800 μ L/min

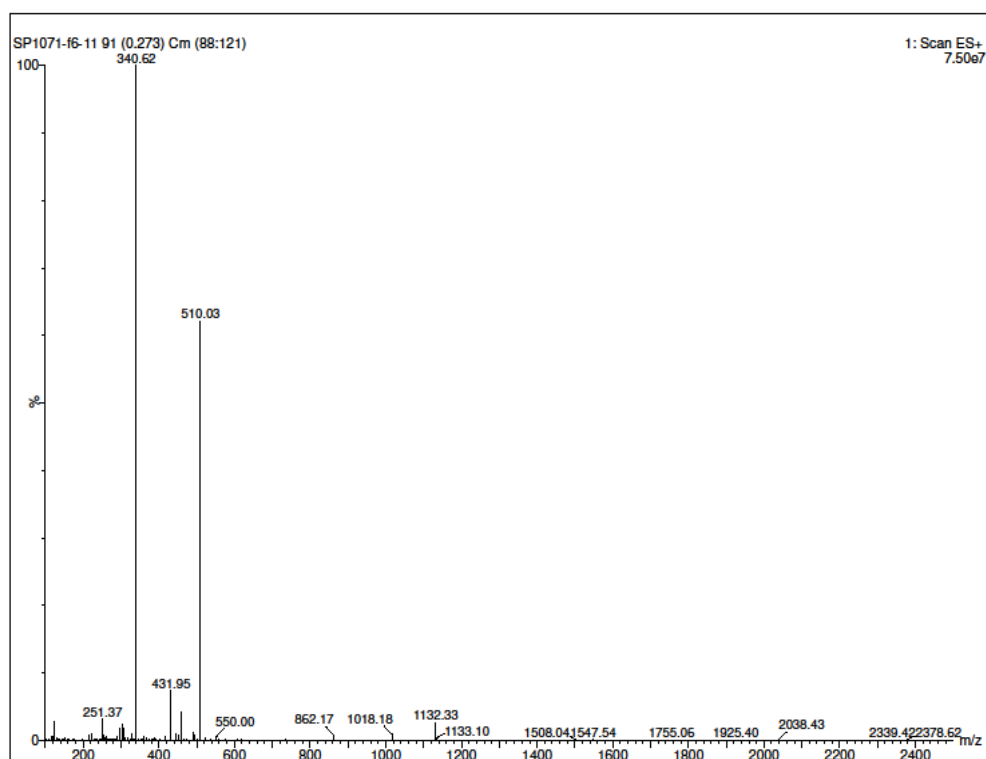
Temps de rétention du produit : 0.28 minutes

Pureté PDA : >92 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 μ mol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg





Code du composé : SP1073

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RKNQCEAR - NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₄₀H₇₂N₁₈O₁₃S₁

Masse attendue : 1045.18

Masse obtenue : 1046.41 (M+1)

524.04 (M+2)/2

349.96 (M+3)/3 (majoritaire)

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm.

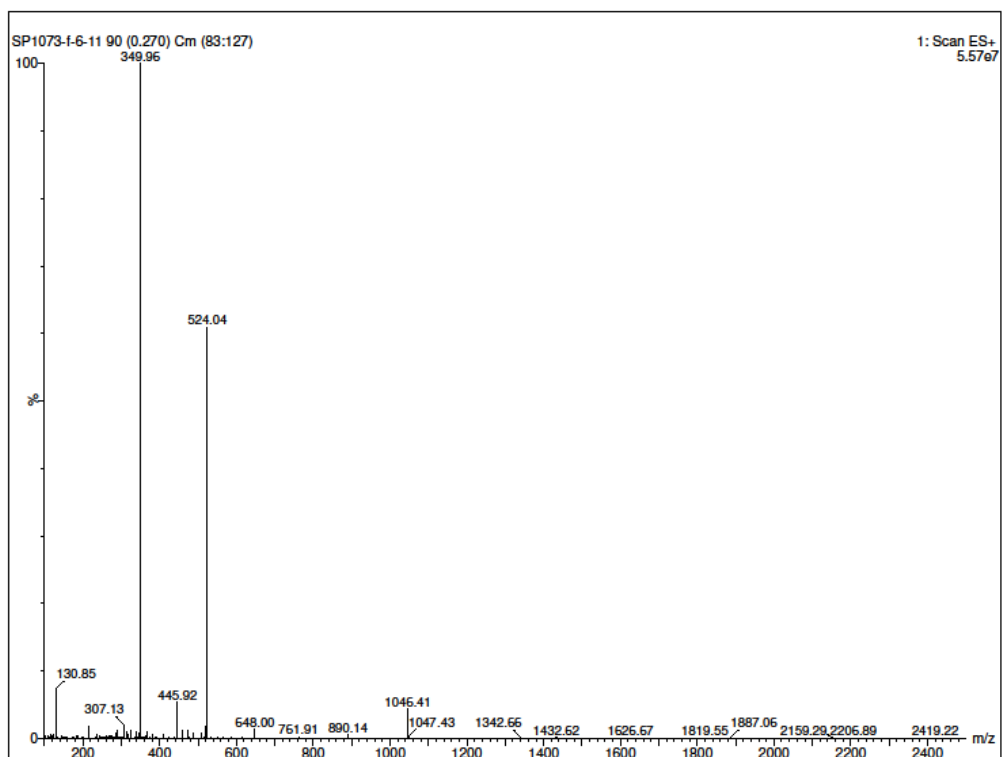
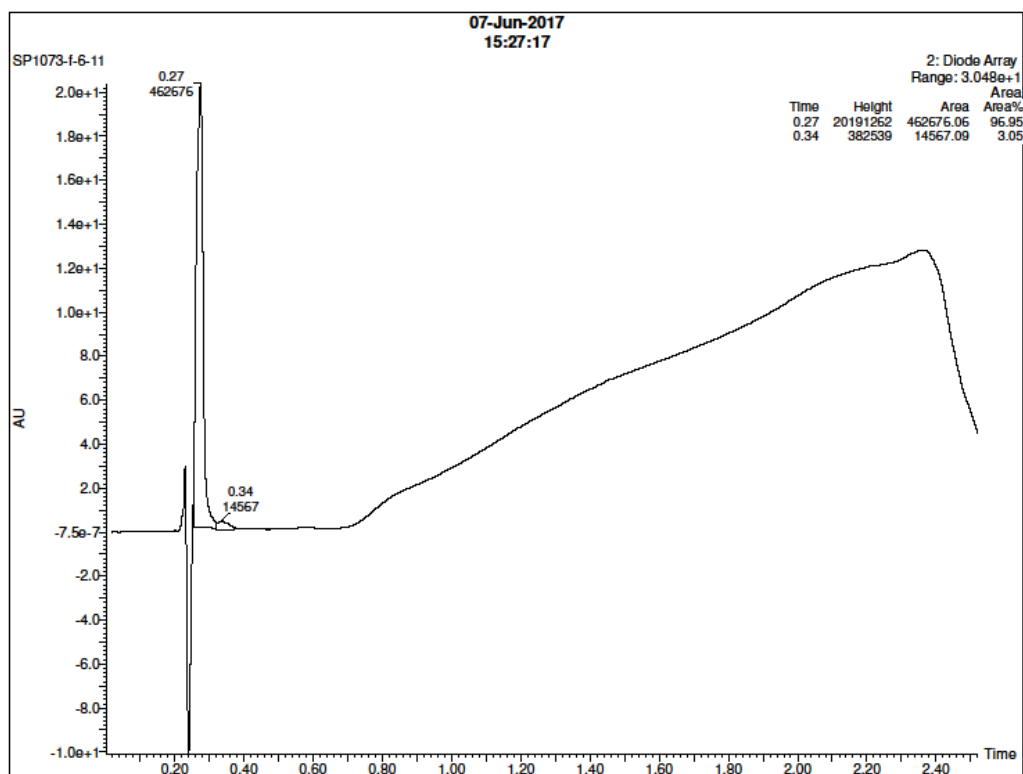
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800 μ L/min

Temps de rétention du produit : 0.27 minutes

Pureté PDA : >96 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 μ mol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1075

11 mai 2017

Structure du composé : Ac - RKNQCET **A** – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Rab4 Ala-Scan

Solubilité : Soluble dans H₂O relativement polaire.

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₃₈H₆₇N₁₅O₁₄S₁

Masse attendue : 990.10	Masse obtenue : 991.39 (M+1) 496.55 (M+2)/2 (majoritaire)
-------------------------	--

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

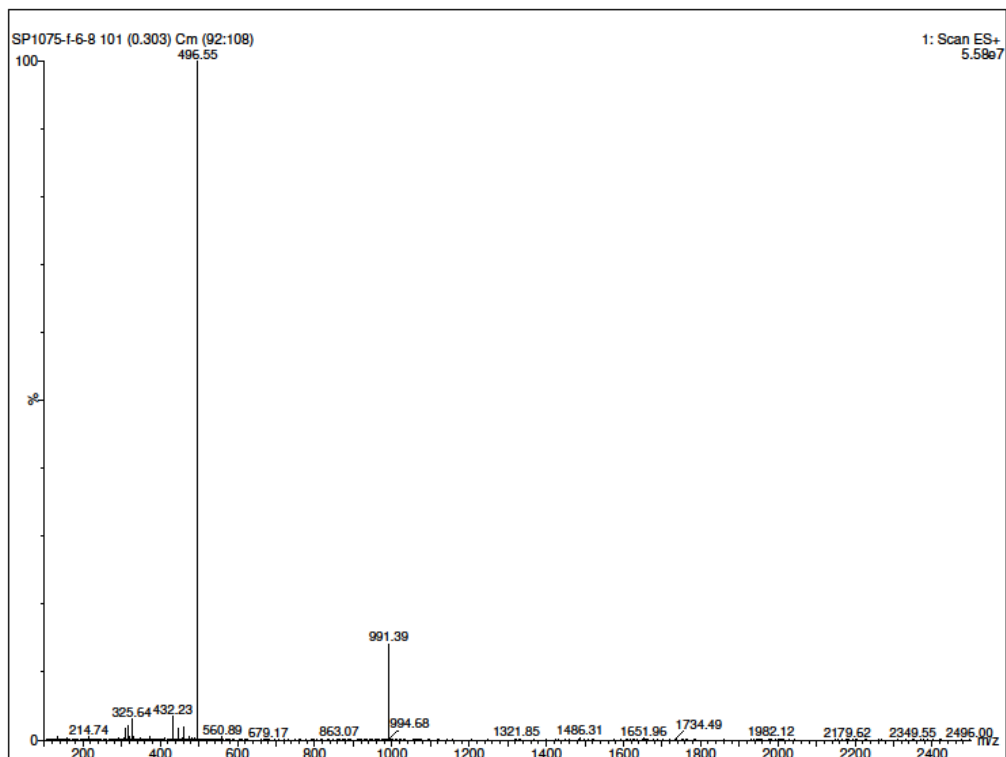
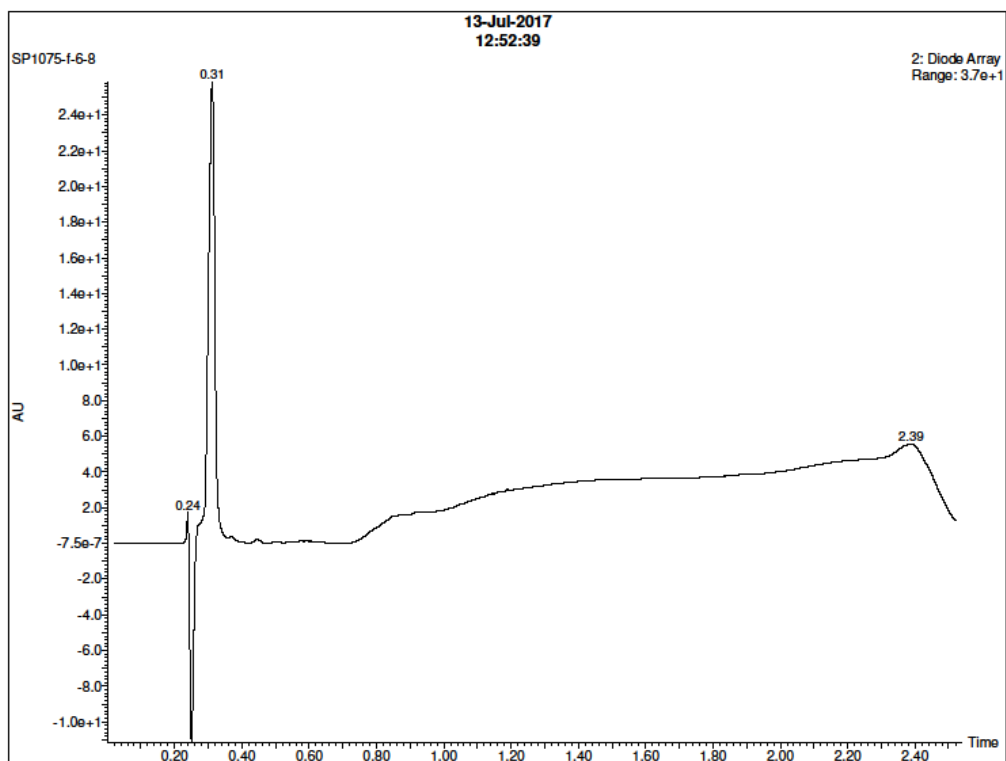
Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 0.31 minutes

Pureté PDA : >95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse et lyophilisation.

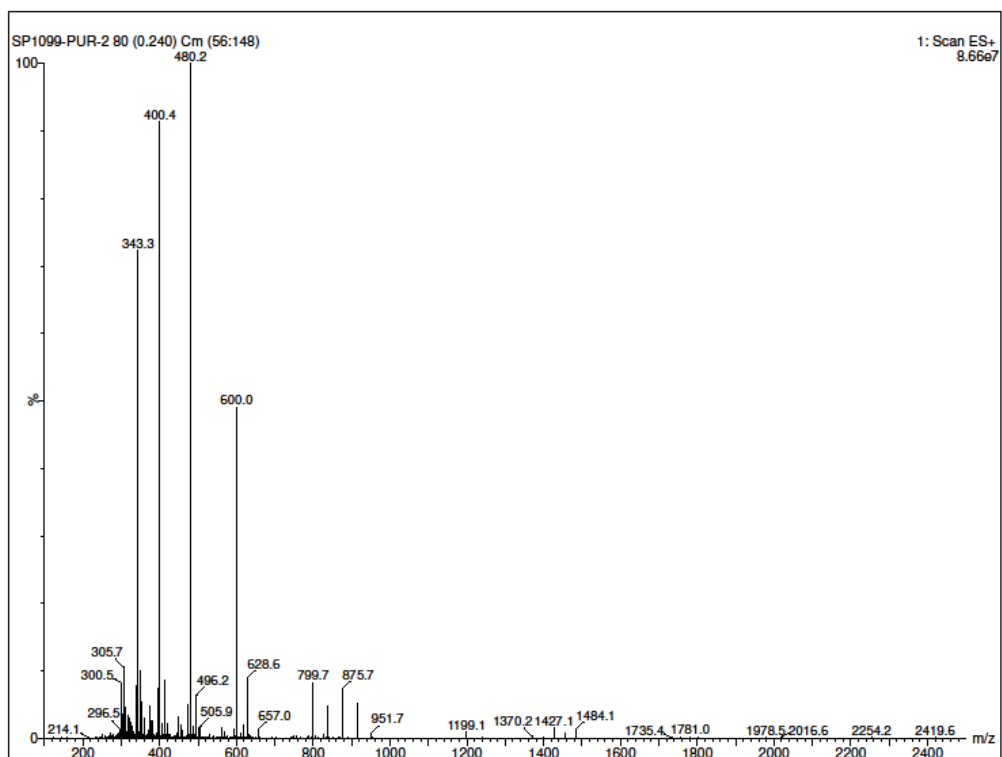
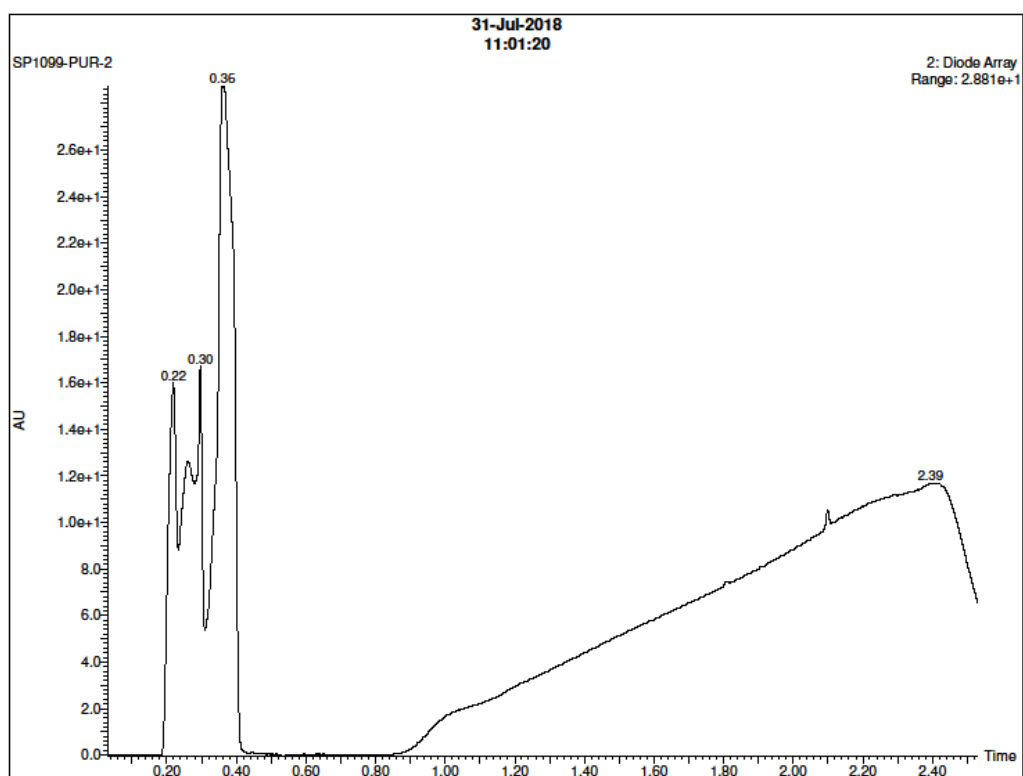
Quantité de peptide : 13.2mg



Code du composé : SP1099

30 mai 2018

Structure du composé : Ac - KRTCRENQ RKRRQRRR – NH ₂	
Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , Scramble-L-PGDS- TAT	
Solubilité : Soluble dans H2O très polaire/chargé	
Spectrométrie de masse Formule brute du composé : C ₉₄ H ₁₇₈ N ₄₈ O ₂₄ S ₁	
Masse attendue : 2396.8	Masse obtenue : 600.0 (M+4)/4 480.2 (M+5)/5 (majoritaire) 400.4 (M+6)/6 343.3 (M+7)/7
Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm. Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min Temps de rétention du produit : 0.22 minutes 0.30, 0.36 minutes (complexé avec TFA) Pureté PDA : >95 %	
Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse (2%→30% ACN) et lyophilisation. Quantité de peptide : 114.4mg	



Code du composé : SP1101

30 mai 2018

Structure du composé : Ac - RKNQCATR**RKKRRQRRR** – NH₂

Projet : Eric Marsault / Jean-Luc Parent , L-PGDS-E90A-**TAT**

Solubilité : Soluble dans H₂O très polaire/chargé

Spectrométrie de masse

Formule brute du composé : C₉₂H₁₇₆N₄₈O₂₂S₁

Masse attendue : 2338.8	Masse obtenue : (M+4)/4 (M+5)/5 (M+6)/6 (majoritaire) (M+7)/7 (majoritaire)
-------------------------	--

Type de colonne : AQUITY UPLC, BEH, C18, 1.7µm, 2.1 x 50 mm.

Gradient utilisé : 0 min, 5% ACN; 0.2 min, 5% ACN; 1.5 min, 95% ACN; 1.8 min, 95% ACN; 2.0 min, 5% ACN; 2.5 min, 5% ACN. Flow : 800µL/min

Temps de rétention du produit : 0.20 minutes
028, 0.32 minutes (complexé avec TFA)

Pureté PDA : >95 %

Description de la synthèse : Fait sur le Symphony-X échelle 100 µmol. Clivage manuel au TFA, précipitation dans l'éther, et évaporation de l'éther. Purification sur C18 en phase inverse (2%→30% ACN) et lyophilisation.

Quantité de peptide : 112.1 mg

